

Evaluation of laboratory and field methods for measuring mosquito repellent efficacy

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Basel

von

Barbara Colucci

aus Murgenthal, Aargau

Basel, 2018

Originaldokument gespeichert auf dem Dokumentenserver der Universität Basel
edoc.unibas.ch

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Auf Antrag von

Prof. Dr. Marcel Tanner

Dr. Pie Müller

Prof. Dr. Marc Coosemans

Basel, den 12. Dezember 2017

Prof. Dr. Martin Spiess

Dekan der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Table of contents

Acknowledgements.....	IV
SUMMARY.....	VI
ZUSAMMENFASSUNG.....	VIII
List of abbreviations.....	X

Chapter 1: INTRODUCTION	1
1. The four objectives of the PhD Thesis	2
Objective 1 – Question: How do protection times of specific mosquito repellents differ between field and laboratory experiments?	3
Objective 2 – Question: Where in Switzerland are suitable sites for field experiments?	3
Objective 3 – Questions: What is the protection of DEET and PMD in the field? What is the corresponding protection of the same mosquito repellents in laboratory experiments?	4
Objective 4 – Question: Are there alternative methods for the WHO arm-in-cage test with improved predictive power?	5
2. Mosquitoes – biology and medical importance	5
2.1 The biology of mosquitoes	5
2.2 Pathogen transmission	6
2.3 Six important mosquito species – Worldwide and for our studies	7
2.3.1 The three mosquito species used in our laboratory experiments	7
1. <i>Anopheles stephensi</i>	7
2. <i>Aedes aegypti</i>	7
3. <i>Culex quinquefasciatus</i>	8
2.3.2 Three important mosquito species collected by the study participants during the field trials	8
1. <i>Aedes vexans</i>	8
2. <i>Aedes geminus/cinereus</i>	8
3. <i>Anopheles plumbeus</i>	8
2.4 Tropical mosquitoes in Europe	9

3. Mosquito repellents	9
3.1 Topical repellents	9
3.2 Recommended active ingredients in mosquito repellents	10
4. The Biocidal Products Regulation ((EU) No 528/2012 (BPR))	11
5. Guidelines for repellent testing	12
5.1 WHO Guidelines for laboratory and field experiments	12
5.2 US EPA Guidelines for laboratory and field experiments	13
5.3 Selection of the guidelines for the current study	15
Chapter 2: Comparison of field and laboratory efficacy studies of topical repellents – a systematic review	23
Chapter 3: Mosquito diversity of the Nature Reserve Langholz, Canton of Aargau	53
Chapter 4: Evaluation of standard field and laboratory methods to compare protection times of the topical repellents PMD and DEET	81
Chapter 5: A new air ventilation system for repellent testing with the WHO arm-in-cage test	108
Chapter 6: GENERAL DISCUSSION AND CONCLUSIONS	118
1. Discussion on Objective 1 – Review of studies with mosquito repellents	119
2. Discussion on Objective 2 – Field sites in Switzerland	123
3. Discussion on Objective 3 – Field and laboratory experiments with 18 participants	123
4. Discussion on Objective 4 – New air ventilation system	125
Critical view	125
Chapter 7: Appendices	133
Flyer: Probanden gesucht!	134
Information für die Studienteilnehmer	135
Schriftliche Einverständniserklärung zur Studienteilnahme	142

Datenblätter MOSQUITOREP	143
Schriftliche Einverständniserklärung zur Studienteilnahme	150
Datenblätter Laborversuch ALETHEIA 2016	151
Information für die Studienteilnehmer	153
<i>Summary of the report for the Federal Office of Public Health (FOPH):</i> <i>“Evaluation von Repellentien gegen Stechmücken und deren Interpretation</i> <i>unter der Europäischen Biozidprodukteverordnung”</i>	159
<i>Im Auftrag des Bundesamtes für Gesundheit (BAG), Schlussbericht</i> Evaluation von Repellentien gegen Stechmücken und deren Interpretation unter der Europäischen Biozidprodukteverordnung	160
Chapter 8: Curriculum vitae	203

Acknowledgements

I would like to express my special appreciation to the members of my PhD committee, Prof Marcel Tanner for his support and his work as faculty representative, my supervisor Dr Pie Müller, Dr Sarah Moore for discussions about field trials and literature and Prof Marc Coosemans for his work as external expert.

Dr Amanda Ross and Prof Christian Burri from Swiss TPH supported my work concerning statistical questions and ethical approvals, thank you both very much for your time and helping suggestions.

I would like to express my special appreciation to my supervisor Dr Pie Müller who was always an important supporter for all kind of questions during the last years. We discussed all kind of difficulties that came up in all the different projects we had and we always found a good solution. Thank you for your help in statistics, the paper writing process, your support and encouragement in participating in internal and external courses, congresses or special events e.g. Tag der Artenvielfalt.

A special thank goes to Stefanie Strauch of the Federal Office of Public Health for their mandate and the financial support. Thank you for your visit during our field trial in the Nature Reserve Langholz, it was a pleasure.

I am grateful for the support of Marcel Murri (Abteilung Wald, Kanton AG) and Corina Schiess (Fachstelle Naturschutz, Kanton ZH) for the approval to conduct the field trials. This was extremely important for my study and I am very happy that everything worked so smoothly. Thank you very much.

A special thank goes to the Freiwillige Akademische Gesellschaft (FAG) for the financial support!

I would like to express my special thanks to Dr Burkhard Kriwet (Vifor Consumer Health Ltd.) for offering and preparing the mosquito repellents for my experiments conducted in 2015 and 2016.

Warmest appreciations to Dr Gabi Müller (Schädlingsbekämpfung Stadt Zürich) and Prof Peter Lüthy (Swiss Federal Institute of Technology in Zürich; ETHZ) for the fruitful discussions about mosquito abundance and control in the Thurauen area. The inspection of the Thurauen area in Zürich with Gabi was a great pleasure, thank you very much.

A special thank goes to Mervi Laitinen for her support during the field and laboratory work in summer 2015. Thank you very much!

All my studies would not have been possible without the great effort of my study participants in the field and in the laboratory trials. Thank you all very much!!!

I would like to express my sincere gratitude to the mosquito rearing team, especially to Danica Jančárová and Salome Keller.

A big thank to my friends of the Health Interventions Unit and the Vector Control Group for their inputs and lively discussions about mosquitoes! It was a pleasure to work with you!!!

Many thanks to Margrith Slaoui, Nora Bauer, Christine Mensch, Dagmar Batra, Laura Innocenti and Monika Neuhold for their support at Swiss TPH.

Thanks the IT Team for their support and help in all kind of laptop emergencies.

Martin Eggimann installed the new air ventilation system in our test room and the members of the technical service, Paul Haas, Fabien Haas, Thierry Brun and Dirk Stoll supported the events, thank you all for your help!

I am deeply thankful for my friends at Swiss TPH and all the friendships I developed during traveling, meetings and courses all over the world. Special thanks go to my office colleagues and lab mates: Nina, Kathrin, Noemi, Sofie, Richard, Gaoussou, Harvy, Joseph, Noemi and many, many more! My warmest appreciations go to my family, especially to my parents Lea and Giovanni Francesco Colucci-Siegrist for supporting my way to develop my skills as a passionate biologist and epidemiologist. I thank my brother Matthias, his wife Rahel, Oswald, Herbert, Magda, Ruth, Hanspeter and the family members and friends that passed away too early: Grosi, Fritz, Therese, Marlene, Nonna, Nonno, Bertha, Johanna, Lina, Alfred, Ernst and Paul.

I would like to thank Yamenah, Inés, Sabrina, Sandra, Andrea and David for the lively discussions about science, excellent dinners and lunches and the great time!!! Special thanks go to Luzia, Helena, Mario, Andreas, Carlos and Peter for their support.

Last but not least special thank goes to my friends of the floor ball team of the University Sport Basel and the PS Oftringen for the exciting competitions!

SUMMARY

Mosquito repellents are on the market since more than 60 years and represent a good solution for travellers to endemic areas where mosquitoes may transmit several diseases. But how long does a repellent protect against mosquito bites? Mosquito repellents are usually tested in the laboratory with the arm-in-cage test method and the results are the basis for the label claim. The general assumption is that protection times measured under laboratory conditions are a good proxy for the repellent's efficacy under end user conditions. However, it remains unclear how informative the arm-in-cage test is.

As a first approach to answer this question, a systematic literature search was conducted to review the efficacy of the four most used active ingredients DEET, PMD, Icaridin and EBAAP both under laboratory and field conditions in order to assess the predictive value of the arm-in-cage test. The available data from the literature were, however, insufficient to draw a clear conclusion.

Therefore a comparative study with field and laboratory experiments was conducted, measuring the efficacy of repellents. In two nature reserves, Langholz (Canton of Aargau) and Thuraun (Canton of Zurich) as well as under laboratory conditions the protection of 15% DEET and 15% PMD was assessed and compared between field and laboratory using the same 18 study participants. In the field, both DEET and PMD provided full protection up to at least 6 hours, while in the laboratory DEET 15% protected for a maximum of 30 minutes against *Ae. aegypti*, 2 hours against *An. stephensi* (95% CI: 1 – 3 hours) and 2 hours (95% CI: 1.5 – 3.5 hours) against *Cx. quinquefasciatus*. For PMD 15% median CPTs in the arm-in-cage test were slightly lower for *An. stephensi* and *Cx. quinquefasciatus* with times of 0.5 hour (95% CI: 0.5 – 1 hour) and 1 hour (95% CI: 0.5 – 1.0 hour), while average CPT for *Ae. aegypti* was again a maximum of 0.5 hour.

During these and previous experiments it was observed that mosquitoes being repeatedly exposed to repellents in the arm-in-cage test change their behaviour during the course of an experiment. The hypothesis was then that mosquitoes become adapted to odours trapped inside the cage; and hence are less responsive to neither the repellent nor the human odour cues. To test whether air trapped inside the cage may influence mosquito behaviour a subsequent series of experiments were carried out to investigate if air ventilation has an influence on the biting behaviour of the mosquitoes. Tests were performed with 10 study participants and the repellents DEET 30% and PMD 30%.

The complete protection times measured against *Ae. aegypti* with air ventilation were between 0.5 – 1.5 hours for DEET 30% and between 0.5 – 1 hour for PMD 30%. Without air ventilation the protection times for DEET 30% were between 0.5 and 2 hours and for PMD 30% 0.5 and 1 hour. DEET 30% repelled *An. stephensi* between 0.5 – 5 hours and PMD

30% protected the study participants between 0.5 – 1.5 hours with the air ventilation. Without air ventilation DEET 30% protected for 1 – 5 hours and PMD 30% for 0.5 – 2 hours. However, ventilation had no significant effect on the complete protection times, yet mosquitoes in air-ventilated cages seemed to remain more active over time in the negative controls.

Methods for repellent testing in the laboratory (arm-in-cage test) and in the field (HLC) are well explained in the guidelines of the WHO and the US EPA and I would highly recommend following these guidelines to get comparable results. This was one of the biggest problems in the review study where I was looking for protection times of repellents in field and laboratory experiments. Additionally, I would recommend measuring complete and relative protection as well as landing rates of mosquitoes in field and laboratory experiments to get a better overview of the biting pressure.

As long as the experimental designs vary in such an enormous way despite existing guidelines an interpretation of the studies and the measured protection times is extremely difficult. Our experiments were based on the guidelines and it was difficult anyway to compare the results of both methods. But it is possible figure out a tendency. In general it can be observed that repellents with good protection times in the laboratory were also effective in the field as shown in the review and my own field and laboratory studies.

ZUSAMMENFASSUNG

Mückenschutzmittel sind seit Mitte der 50-er Jahre auf dem Markt und eine gute Lösung für Reisende in Gebiete, in welchen durch Mücken übertragene Krankheiten eine Gefahr darstellen. Doch wie lange schützen die verschiedenen Mückenschutzmittel gegen Stiche?

Die Mückenschutzmittel werden normalerweise im Labor geprüft mit dem sogenannten Arm-im-Käfig Test und die Ergebnisse sind die Basis für die Angaben von Schutzzeiten auf den Produktebeschriftungen. Es gilt die Annahme, dass die gemessenen Schutzzeiten im Labor einen guten Anhaltspunkt für den Schutz im täglichen Gebrauch bieten aber es bleibt unklar, wie informativ der Arm-im-Käfig Test wirklich ist.

Um einen Überblick über bereits vorhandene Feld- und Laborstudien zu gewinnen, wurde eine systematische Literaturrecherche (Review) über die meist genutzten, aktiven Wirkstoffe DEET, PMD, Icaridin und EBAAP gemacht, um gemessene Schutzzeiten aus Feld- und Laborversuchen zu vergleichen. Die Datenlage führte aber zu keinem eindeutigen Ergebnis und so planten wir eigene Studien, welche vergleichbare Daten aus Feld- und Laborversuchen liefern sollen. In zwei Naturschutzgebieten, im Langholz (AG) und den Thurauen (ZH), fanden Feldversuche mit 18 Probanden statt, welche die beiden Mückenschutzmittel DEET 15% und PMD 15% testeten. Im Feldversuch zeigten beide Mückenschutzmittel eine Schutzzeit von bis zu sechs Stunden während im Labor DEET 15% im Schnitt eine maximale Schutzzeit von 30 Minuten gegen *Ae. aegypti* zeigte, 2 Stunden gegen *An. stephensi* (95% KI: 1 – 3 Stunden) und 2 Stunden (95% KI: 1.5 – 3.5 Stunden) gegen *Cx. quinquefasciatus*. PMD 15% schützte weniger gut im Laborversuch und so lagen die durchschnittlichen Schutzzeiten gegen *An. stephensi* und *Cx. quinquefasciatus* bei 30 Minuten (95% KI: 0.5 – 1 Stunde) und bei 1 Stunde (95% KI: 0.5 – 1.0 Stunde) gegen *Ae. aegypti*.

Während diesen und vorgängigen Versuchen wurde eine Verhaltensänderung von Stechmücken während Experimenten mit Mückenschutzmitteln im Arm-im-Käfig Test festgestellt. So entstand die Hypothese, dass die Stechmücken sich an die Gerüche des Mückenschutzmittels oder den Menschen gewöhnen und während eines Experiments ihr Verhalten ändern. Um zu testen, ob die sich anreichernden Gerüche im Testkäfig einen Einfluss auf das Stechverhalten der Mücken haben, wurden verschiedene Experimente durchgeführt und ein neues Lüftungssystem kam zum Einsatz. Es wurde mit 10 Probanden und den beiden Mückenschutzmitteln DEET 30% und PMD 30% getestet.

Die Schutzzeiten gegen *Ae. aegypti* mit gelüfteten Käfigen lagen bei 0.5 – 1.5 Stunden für DEET 30% und zwischen 0.5 – 1 Stunde für PMD 30%. Ohne Lüftung lagen die Schutzzeiten für DEET 30% zwischen 0.5 und 2 Stunden und für PMD 30% bei 0.5 und 1 Stunde. DEET 30% schützte gegen *An. stephensi* zwischen 0.5 – 5 Stunden und gegen

PMD 30% zwischen 0.5 – 1.5 Stunden mit Lüftung. Ohne Lüftung schützte DEET 30% während 1 – 5 Stunden und PMD 30% für 0.5 – 2 Stunden. Die Lüftung hatte in diesem Fall keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Schutzzeiten, allerdings schienen die Mücken in den gelüfteten Käfigen bei den Kontrollen vor und nach den Versuchen wesentlich aktiver zu sein.

Es existieren ausführliche Richtlinien der WHO und der US EPA für die Durchführung von Mückenschutzmitteltests im Labor (Arm-im-Käfig Test) und im Feld (HLC) und ich würde empfehlen, diese zu befolgen um vergleichbare Daten zu generieren. Dies war eines der Hauptprobleme bei der Analyse der Studien zur Überprüfung der Schutzzeiten von Mückenschutzmitteln im Feld und im Labor. Zusätzlich würde ich empfehlen, dass nicht nur die absolute sondern auch die relative Schutzzeit gemessen werden sollte sowie die Landeraten der Stechmücken im Feld- und im Laborversuch, um einen besseren Überblick über den Stechdruck zu erhalten.

Solange die Studiendesigns trotz Richtlinien so extrem unterschiedlich ausfallen, sind Interpretation und Vergleich von Schutzzeiten extrem schwierig. Selbst bei unseren Experimenten, basierend auf den Richtlinien, sind die Resultate der beiden Methoden schwer zu vergleichen aber dennoch lassen sich Tendenzen ausmachen. Generell lässt sich sagen, dass Mückenschutzmittel, welche im Labor eine gute Schutzwirkung zeigen, auch im Feld einen guten Schutz bieten, wie die Literaturrecherche (Review) und meine Feld- und Laborstudien zeigten.

List of abbreviations

AI	Active ingredient
%R	Percent protection
BPR	Biocidal Product Regulation
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CPT	Complete protection time
DEET	N-dimethyl-m-toluamide
EBAAP	Ethylbutylacetylaminopropionate
HLC	Human landing catch
Icaridin	2-(2-Hydroxyethyl)-piperidinecarboxylic acid 1-methyl ester
PMD	p-menthane-3,8-diol
PRISMA	Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses
RPT	Relative protection time
US EPA	United States Environmental Protection Agency
WHO	World Health Organization

Chapter 1

INTRODUCTION



Culex quinquefasciatus (female)



Culex quinquefasciatus (male)



Resting female mosquito

INTRODUCTION

1. The four objectives of the PhD thesis

More than 50% of the world's population live at risk to become infected by a mosquito-borne disease such as malaria, West Nile fever, Zika, dengue, chikungunya, Japanese encephalitis or lymphatic filariasis [1]. Travellers to endemic countries are advised to protect themselves as good as possible with adequate clothing, bed nets or repellents [2-4].

Mosquito repellents are on the market since more than 60 years [5-7] and only products with effective active ingredients are allowed to enter the European market [8, 9]. Protection times greatly vary between formulations and active ingredients; and hence for the consumer it is very important to know for how long the protection of a repellent lasts. This is usually stated on the label of a product as well as the formulation type (cream, lotion or spray) and the application method should be explained on the label [8].

Under the EU Biocidal Products Directive 98/8/EC (BPD) repellents are classified as biocides – product type 19 – and as such are subject to rigorous efficacy studies. The new regulation of the European Biocidal Products Regulation (EU) 528/2012 came into force on September 2013 with the intension to place new products easier on a new market [8, 10]. The regulation aims to ensure human and environmental safety of biocidal products and biocide-treated materials. Some products are tested only within the European Union but others have to be proved and authorized by the Federal Office of Public Health in Switzerland in a second process [11].

It is assumed that protection times of repellents commonly measured in laboratory experiments equates to the same protection time experienced by users in the field. However, this has never been carefully evaluated as presented in the review (chapter 2) and therefore we designed new comparative studies to measure protection times in the field and in the laboratory. In the field and laboratory trials, human subjects tested two types of well-known topical repellent actives (DEET (15%) and PMD (15%)) against mosquitoes both under laboratory conditions in so called arm-in-cage tests and under field conditions with the human landing catch method. This was the first study that combined laboratory and field data and used the same human subjects in both situations to control the subject variability which is known to vary greatly [12, 13]. The findings are crucial in guiding authorities (e.g. Federal Office of Public Health) in reviewing label claims made by industry when registering new topical repellent products against mosquitoes as well as to improve the methods for research and development of new repellent formulations.

Objective 1 – Question: How do protection times of specific mosquito repellents differ between field and laboratory experiments?

There are seven topical repellents registered with United States Environmental Protection Agency (US EPA) as tested to be effective against mosquito bites [14-16] and five in Canada [17]. Mosquito repellents are usually tested by companies under laboratory conditions with the arm-in-cage test method [18, 19].

Objective 1 – Research approach (chapter 2 of the thesis)

A systematic review was carried out following the instructions of PRISMA [20]. PRISMA focuses on different ways in which authors can ensure the transparent and complete reporting of systematic reviews inclusive meta-analyses. Six databases were screened using the search term «mosquito repellent» and «mosquito repellents» from 1946 till December 2016. The aim of this literature search was to find all publications with data carried with human beings in field and laboratory experiments. The protection time of at least one of the four mosquito repellents must be tested in the study [14, 16, 17, 21]:

- **DEET:** (*N,N*-diethyl-*m*-toluamide or *N,N*-diethyl-3-methyl-benzamide)
- **PMD:** chemical name: para-menthane-3,8-diol or Oil of lemon eucalyptus (OLE)
- **EBAAP:** IR3535; chemical name: 3-[*N*-butyl-*N*-acetyl]-aminopropionic acid, ethyl ester
- **Icaridin:** KBR 3023 or picaridin,
Chemical name: 2-(2-hydroxyethyl)-1-piperidinecarboxylic acid 1-methylpropyl ester

Objective 2 – Question: Where in Switzerland are suitable sites for field experiments?

Conducting field experiments using the human landing catch (HLC) method requires field sites showing high numbers of mosquitoes in summer, access to different water bodies with flying mosquitoes to place the study participants at suitable positions, and locations where no disease transmission by vectors can occur. In Aargau is a Nature Reserve with many fresh water bodies of different sizes. This region is in a forest near Rothrist and is called Langholz. In this Nature Reserve I measured mosquito diversity and abundance.

Objective 2 – Research approach (chapter 3 of the thesis)

A pilot project was carried out to find locations in Switzerland where the field experiments with different dominant mosquito species could be carried out. The study report “*Vorkommen von Stechmücken im Naturwaldreservat Langholz, Kanton Aargau*” reported the biodiversity in the Nature Reserve Langholz in Switzerland and was a mandate paid and supported by the Canton of Aargau. As the World Health Organisation (WHO) [19] recommends two field sites for the HLC another Nature Reserve in the Thurauen area (Canton of Zurich) was found in collaboration with colleagues from Zurich.

Objective 3 – Questions: What is the protection of DEET and PMD in the field?

What is the corresponding protection of the same mosquito repellents in laboratory experiments?

I tested the two repellents DEET 15% and PMD 15% in two Nature Reserves in Switzerland with 18 study participants. The recommended method for field trials was the HLC and the complete (CPT) and the relative protection (%R) were measured. The same participants tested the same repellents in the laboratory with the arm-in-cage method and three different mosquito species.

Objective 3 – Research approach (chapter 4 of the thesis)

The two active ingredients DEET 15% and PMD 15% (or ethanol only as a negative control) were tested first in a large field trial with 18 study participants in two different Nature Reserves, Langholz and Thurauen, in Switzerland following the guidelines of WHO [19] and US EPA [18]. The method of choice in the field was the HLC [19, 22]. The 18 subjects were first split into three groups of six volunteers that tested the repellents over three consecutive days. On the first of these three days the volunteers were randomly assigned to one of the three treatments. Both locations were known for their species populations and high abundances in summertime [23, 24]. The laboratory experiments took place at the Swiss Tropical and Public Health Institute (Swiss TPH) in Basel with the three anthropophilic mosquito species *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. Tests were done with WHO test cages and the arm-in-cage test method.

Objective 4 – Question: Are there alternative methods for the WHO arm-in-cage test with improved predictive power?

Differences in mosquito behaviour during repellent tests have indicated an influence of an evaporating repellent in the cage as well as the number of mosquitoes per test cage [25]. First experiments with a new test cage and an air ventilation system were performed [26].

Objective 4 – Research approach (chapter 5 of the thesis)

It is possible that mosquitoes become adapted to odours trapped inside a test cage. These odours in the cage can be from the human skin or the applied repellent. To find out if air ventilation has an influence on the behaviour of the mosquitoes I tested the two repellents, DEET and PMD, at a concentration of 30%, with ten study participants. Two WHO cages per study participant were used and just one of them was positioned in front of the new air ventilation system and replaced the air in the cage for 2 minutes after the exposition of the treated forearm of a study participant.

2. Mosquitoes – biology and medical importance**2.1 The biology of mosquitoes**

Three quarters of all mosquito species live in the tropics or subtropical areas where the temperature is ideal for a rapid development of the juvenile stages and for adult survival. Mosquitoes can be found throughout the whole world with the exception of areas that are permanently frozen. Mosquitoes belong to the family Culicidae with three subfamilies: Toxorhynchitinae, Anophelinae and Culicinae. There are globally 3,500 species known and 38 species can be found in Switzerland [1, 24, 27, 28].

After an extensive blood meal a female mosquito is able to lay 50-500 eggs at a time. This is possible several times per year [28]. *Anopheles* species deposit their eggs singly onto the water surface or next to it so that they will be flooded by water and the hatched mosquito larvae can survive easily in the water, whereas *Culex* species lay their eggs in rafts or batches with several hundred eggs being together in a boat-shaped structure [1]. The embryo in the egg needs several days, depending on temperature, to develop into the first larval stage and start the life cycle in the water. Mosquito larvae prefer stagnant water and

small amounts of water in a tree whole, puddle, pool or man-made containers are enough to let the larvae grow.

The larvae are filter feeders and eat microorganisms, algae, protozoa or detritus and breathe with help of a siphon [1, 28]. After the fourth larval stage the pupa is in the last stage before the adult mosquito is emerging. Male and female adults feed on nectar and water. After mating, female mosquitoes require proteins to develop their eggs and are then looking for a host to get a blood meal. At a distance of up to 36 meters mosquitoes are attracted by carbon dioxide, body odour from potential hosts, while at the short distance body temperature, sweat and moisture are also used as a cue for host seeking [12, 29, 30].

As soon as a host is found the mouthparts of the female mosquito penetrate the skin and saliva is injected to prevent haemostasis [28]. The saliva of a mosquito contains several proteins that are responsible for characteristic skin reactions. One example is the saliva of *Ae. aegypti* which contains more than 31 proteins that are potential allergens [31] (more about allergic reactions is mentioned in the appendix). Adult mosquitoes have a life span of several days or weeks, or even longer and some species may overwinter and can live for approximately one year.

2.2 Pathogen transmission

Mosquitoes accumulate pathogens and parasites (e.g. viruses, bacteria, fungi, nematodes and protostans) through blood-meals. Some of these organisms are parasitic, some have a parasitic and free-living phases and others alternate between mosquitoes, vertebrate or invertebrate hosts. The immune system of the mosquito has two main defence mechanisms, encapsulation or protection by the cibarial armature [28, 32, 33]. Pathogens develop or replicate in the gut of the female mosquito, then enter the hemocoel and finally migrate to the salivary glands (viruses and protozoans) or the mouthparts (worms). As soon as the parasites enter the hemocoel they get in contact with cells of the mosquito's immune system, the hemocytes. Especially the peritrophic hemocytes engage the rapid phagocytosis of the pathogen [33]. Infected mosquitoes are not as fit as non-infected ones and the parasite infection influences many different aspects of a mosquito's life such as biting persistence when infected with malaria [34] or probing behaviour [35]. In the study of Koella *et al.* [36] *Ae. aegypti* showed a different host-seeking behaviour when infected with *Plasmodium gallinaceum* at a specific parasite stage.

2.3 Six important mosquito species – Worldwide and for our studies

2.3.1 The three mosquito species used in our laboratory experiments

Repellent tests should be conducted with at least three different mosquito species that are highly anthropophilic [19]. The adult mosquitoes at Swiss TPH were fed with 10% sucrose solution and water *ad libitum*. Testing and rearing conditions for all mosquito colonies were maintained at 27 ± 2 °C and $60\% \pm 10\%$ relative humidity (RH) and a 12:12 (light:dark) photoperiod. Male and female mosquitoes were kept in the same rearing cages to allow mating to occur. Twelve hours before the experiment, the sugar water was removed from the cage and the mosquitoes had only access to water.

1. *Anopheles stephensi*

An. stephensi is a major vector for the malaria parasites *P. falciparum* and *P. vivax* with a geographical range from the Middle East through India up to China. From the 3,500 mosquito species worldwide, *An. stephensi* represents 430 *Anopheles* species of which 30-40 are able to actually transmit malaria parasites. *Anopheles* larvae utilise fresh water pools, catch basins, stream beds or domestic water containers. The female mosquitoes prefer the human host for blood meals but bite animals (e.g. cattles) as well. They are nocturnal (active at night) or crepuscular (active at dusk or dawn) and indoor (endophagic) or outdoor (exophagic) biters. *An. stephensi* is found throughout the year in urban areas and the peak of abundance coincides with the peak of malaria transmission in those areas. The female mosquitoes enter houses and bite humans during night [28, 37, 38]. Experiments with *Anopheles* mosquitoes have shown that their labella are sensitive to detect salt, sucrose, quinine or DEET [39].

2. *Aedes aegypti*

Ae. aegypti, also called the yellow fever mosquito, is a day-active, tropical mosquito species and is in those regions the main vector for dengue, yellow fever, chikungunya and Zika. *Ae. aegypti* is a very aggressive biter and prefers the human host as blood source. Meanwhile there are no climatic reasons why *Ae. aegypti* could not survive in southern Europe. *Ae. aegypti* disappeared from Europe in the first half of the 20th century but due to sea traffic the colonisation was reported from Madeira in 2004. Over the past 25 years its distribution increased worldwide and therefore also the risk of diseases transmissions has risen in European countries [28, 40-43].

3. *Culex quinquefasciatus*

Cx. quinquefasciatus is abundant in tropical and subtropical areas and is closely related to *Cx. pipiens* that are highly abundant in Switzerland. *Cx. quinquefasciatus* is a vector of several pathogens affecting humans and wild animals (mainly birds). These pathogens include for example West-Nile virus, Western equine encephalitis virus, St. Louis encephalitis virus and filariasis. Female mosquitoes enter houses to bite humans from dawn to dusk and show the highest biting activity around midnight [28, 44, 45].

2.3.2 Three important mosquito species collected by the study participants during the field trials

In the field trials in Langholz and the Thuraueu any insect landing on the treated lower leg of the study participants were collected with a mouth aspirator and kept in tubes for further analysis. With the exception of the lower leg the remaining body of the study participants were fully protected from mosquito bites by a white jump suit, a bee keeper's hat and latex gloves.

1. *Aedes vexans*

Like other floodwater mosquitoes, *Ae. vexans* lays high numbers of eggs in temporarily flooded areas. In contrast to other species, *Ae. vexans* is known to have a large flight range of several miles [1]. *Ae. vexans* is a day active mosquito and a very aggressive biter that attacks humans from spring to fall [27]. Males and females feed on nectar and for the blood meal females bite preferably mammals such as humans, horses, dogs or cows [23] but also birds [46].

2. *Aedes geminus/cinereus*

Ae. geminus and *Ae. cinereus* are sibling species that are able to transmit diseases, prefer the same habitats and are often found together in the same water bodies. Both species prefer rock pools, marshy pools or edges of streams and the larvae favour moderately shaded water bodies. Both species have at least two generations per year and females are known to prefer humans as a host and become a nuisance when present in high numbers. Males form mating swarms of ten or even less individuals [1].

3. *Anopheles plumbeus*

An. plumbeus is widely distributed across Europe, mainly in forest areas. Usually, larvae develop in tree holes but the mosquito may also use artificial breeding sites below ground,

catch basins or organically polluted septic tanks or other man-made habitats. Larvae are able to survive long periods under water when the surface is frozen. In laboratory experiments, *An. plumbeus* was successfully infected with *P. vivax*, *P. falciparum* and West Nile virus suggesting this species could potentially be an important disease vector [1, 47].

2.4 Tropical mosquitoes in Europe

Mosquitoes become more and more a problem in Europe [42, 48] where first autochthonous cases of disease transmission happened already in Croatia (dengue virus, 2010) [49, 50], France (dengue virus, 2010) [43], Italy (chikungunya virus, 2007) [51, 52] and Madeira (dengue virus, 2012) [53]. The mosquito species *Ae. aegypti*, a container breeder [54], is known to be an excellent vector for dengue virus, chikungunya and Zika and is therefore in the focus of several research projects [55, 56] in which new surveillance methods are being developed [57] and new control options being tested [58, 59].

3. Mosquito repellents

3.1 Topical repellents

Topical repellents are applied on the skin and come in the form of oils, lotions, pump sprays or creams and are still one of the best arthropod bite prevention for travellers [21, 60-62]. The application method should be explained on the label [8] as well as the formulation's protection time. A repellent is a product intended to disrupt the host-seeking behaviour of insects or arthropods, driving or keeping them away from treated human skin [5]. In contrast to topical repellents, spatial repellents disperse the repellent outdoors. Examples are lanterns, candles, soil torches or table-top diffusers.

Topical repellents consist of one or more active ingredients and evaporate after application on the skin because of the body heat. They provide a vapour barrier that refuses the mosquito from coming near to the treated area. Repellents with a low boiling point may vaporize too fast which may reduce the protection time and forces the user to reapply the repellent more frequently. A boiling point between 110°C (230°F) and 126.6°C (260°F) is the optimal range for an effective mosquito repellent [6, 63-65].

Many different factors influence the protection time of a mosquito repellent [66] and fixatives or perfumes have an impact as well [67]. Protection times greatly vary between formulations and active ingredients and for the consumer it is very important to know for how long the protection of a repellent lasts. Active ingredients are usually in a concentration of 10-30% but can go up to 80-100% [68]. Clothes, bed nets, chemoprophylaxis, air condition and screens are other options to become protected from bites at the night [61, 69-71].

3.2 Recommended active ingredients in mosquito repellents

The following sections explain the importance of mosquito repellents and how they are usually evaluated. Guidelines exist to test mosquito repellents under laboratory conditions and in the field but are they sufficient to give a good recommendation for the protection time under real life conditions? The end-user relies on the label claim and the correct use of a mosquito repellent is essential while travelling in risk areas.

The active ingredients DEET and Icaridin are characterised as “conventional repellents”, whereas PMD and EBAAP are so called “biopesticide repellents”. The following active ingredients are registered with US EPA as effective topical repellents [14].

DEET

N,N-dimethyl-m-toluamide or N,N-diethyl-3-methylbenzamide was discovered during the 1940s in the quest for a mosquito repellent for the US Army [72] and came to market in 1956 [30]. DEET is known and used as the “gold standard” repellent recommended by WHO [19]. Indeed, it still remains one of the most effective mosquito repellents and is used in more than 500 products [6, 60, 73-81]. However, a drawback is DEET's property as a solvent of certain plastics, causing damage to wrist bands, fabrics and other synthetic items that come into contact with the treated skin [81]. Concerns have been raised over its safety following reports of potential DEET-associated seizures (in combination with ethanol) including ataxia, respiratory depression, coma, and seizures in infants [81]. However, reported events are extremely rare and a study in pregnant women found no adverse effects when using DEET in 2nd trimester [79, 82-85]. Three to eight per cent of the applied repellent is absorbed by the skin, metabolised and in the urine within 24 hours [81].

Icaridin

Chemical name: 1-piperidinecarboxylic acid 2-(2-hydroxyethyl)-1-methylpropylester): also called picaridin, Bayrepel® or KBR 3023. A concentration of 20% or reapplied frequently is recommended to get similar protection as with DEET. It is an odourless, colourless repellent

that protects the user against mosquitoes, biting flies and ticks and does not damage plastics or other fabric. The Center for Disease Control and Prevention (CDC) [86] recommends both DEET and Icaridin for West Nile virus and malaria prevention [87].

PMD

Chemical name: *para*-Menthane-3,8-diol is the extract of the lemon eucalyptus and comes from the plant *Corymbia citriodora* (synonyms include *Eucalyptus citriodora* and *E. maculate* var. *citriodora*) from China. The Chinese name of PMD is “Quwenling” and means “effective repeller of mosquitoes” [88]. It was discovered in the 1960’s [89]. Today, PMD is chemically synthesized for mosquito repellents. PMD 20% showed protection for 7-8 hours in the laboratory experiments of Trongtoit *et al.* [90] and showed similar protection times as DEET in the studies of Uzzan *et al.* [91], Carroll *et al.* [92] and Trigg [93].

EBAAP

(Ethyl-butyl-acetylaminopropionate) or IR3535: 3-(N-acetyl-N-butyl) aminopropionylethyl ester [94]. EBAAP was developed in the 1970's and is based on the amino acid z-alanine [95]. There exists no ISO common name and this insect repellent is not under patent. EBAAP can be used as an insect repellent on the skin and on clothing [96].

The following three active ingredients are just in one till three products used [14].

- 2-Undecanone
- Catnip oil: *Nepeta cataria* or catmint
- Oil of citronella.

Several products exist on the market but none is registered by the US EPA equally to citronella, cedar, geranium, peppermint or soybean oil. Products containing these active ingredients have not been evaluated for their effectiveness but show minimal risk to human health at the percentages found in available products on the market [15].

4. The Biocidal Products Regulation ((EU) No 528/2012 (BPR))

Before a biocidal product can be made available or used on the European market (EU)/European Economic Area (EEA) it must be authorised. This process is regulated by the Biocidal Product Regulation (BPR) that ensures a high level of protection for the user and

the environment [8, 9]. Biocidal products are used to protect humans or animals against harmful organisms like pests or bacteria. The new BPR is in force since September 1st 2013 and repeals the Biocidal Products Directive (Directive 98/8/EC) [8].

The new BPR simplifies the approval of active substances and the authorisation of products on market at Union level. Due to mandatory data sharing obligations and encouragement for the use of alternative testing methods the number of animal testing should be reduced.

In the United States of America the US EPA is responsible for the registration of new repellents. Registered active ingredients have been approved for human safety and effectiveness when applied as recommended on the label. Evaluated products by the US EPA assure to not pose children, pregnant women or vulnerable people at risk [15].

5. Guidelines for repellent testing

5.1 WHO Guidelines for laboratory and field experiments

The “*WHO Guidelines For Efficacy Testing of Mosquito Repellents For Human Skin*” provide standardised procedures for laboratory experiments and field trials [19]. These guidelines explain testing procedures for efficacy testing and evaluation of mosquito repellents applied to human skin.

Repellent tests for field trials and laboratory experiments

Similar for both tests is the definition of the complete protection time (CPT). CPT is the time between the application of a mosquito repellent until the first landing or probing of a mosquito. A 20% ethanolic DEET solution is recommended as the positive control and equal numbers of female and male subjects are preferred. The volunteers should avoid fragrance products and the consumption of tobacco for at least 12 hours before and during the running experiment.

Field trials: Field trials should be planned in two different ecological or geographical settings. The volunteers are placed at least 20 meters from each other during field trials and collect all landing mosquitoes with aspirators. The treated skin area could be a forearm or a lower leg with the specific dose of repellent depending on the size. A non-treated volunteer (ethanol only) should be included in the test as a negative control and DEET (20%) may be used as a positive control. Landing and probing mosquitoes on the treated skin should be

collected for identification. Information such as wind speed, temperature, relative humidity and precipitation amount should be recorded during an experiment.

Laboratory experiments: It is recommended to use three or more anthropophilic mosquito species for laboratory experiments. Recommended species are *Ae. aegypti*, *Cx. quinquefasciatus*, *An. stephensi*, *An. gambiae* or *An. albimanus*.

The mosquito test cage size should be 35-40 cm per side and filled with 200-250 non-blood-fed female mosquitoes. Mosquitoes should be 5 - 7 days old for arm-in-cage tests and must be reared under standardised conditions (27 ± 2 °C, relative humidity $70 \pm 10\%$ and a 12:12 (light:dark) photoperiod. The readiness of the mosquitoes must be tested before the experiments start by inserting a cleaned and untreated forearm into the prepared test cage for 30 seconds or until 10 mosquitoes landed or probed on the forearm. The amount of repellent is 1 ml per 600 cm² of the subjects forearm. After 30 minutes following the application of the repellent the treated forearm is inserted into the test cages for 3 minutes, followed by a 27 minutes break. The complete protection time is one possibility to measure the efficacy of a repellent after application on the subject skin. It is calculated from the time of application until the first landing and or probing.

5.2 US EPA Guidelines for laboratory and field experiments

Before manufacturers can sell their products on the US market, US EPA evaluates to ensure they meet the federal safety standards for protecting human health and the environment [18].

In contrast to the WHO guidelines, the US EPA guidelines define CPT as the time after application of the repellent on the skin until the first confirmed event. A confirmed event could be a landing, probing or biting followed by another similar event within 30 minutes. It is also possible to define the first event (landing, biting, crossing) as the failure of the repellent. Another possibility for measuring the protection time of a repellent is Relative Protection (RP). RP compares the efficacy of a treatment to an untreated control.

Definitions: landing (alighting on the skin but no probing or biting), probing (penetrating the human skin by the mouthparts without blood meal) or biting (penetrating the human skin with blood meal). Control subjects should not act as their own untreated control.

Laboratory experiments: Studies with *Ae. aegypti*, *An. spp.* and *Cx. quinquefasciatus* are the recommended species for repellent tests. Mosquitoes should be reared at 27 ± 3 °C with a relative humidity of $70\%\pm 10\%$ and with a photoperiod of 16:8 hours (light:dark). Female mosquitoes should have an age between 5-10 days for the experiment and should starve 12-24 hours before testing. There should be 200 mosquitoes in a cage of 1,160 cm³.

The forearm of the volunteer should be washed with soap, rinsed with a solution of ethanol and dried with a towel. The hand should be protected with a glove during the experiment. Before the repellent test starts the volunteer should expose the untreated forearm into a cage with mosquitoes to confirm the mosquito activity and biting pressure. If less than 5 mosquitoes land within 1 minute all mosquitoes will be removed and new ones will be tested again. The repellent test should start 30 minutes after treatment with the repellent. Volunteers should avoid rubbing their repellent treated arms during or after exposing periods. Mosquitoes are used only once and will be disposed immediately after the experiment.

Field trials: Repellent testing should not be conducted in areas where West Nile virus or other diseases transferred by mosquitoes have been detected within the previous two weeks. Experiments should be done in at least two different environments (e.g. forest, grassland, wetland, barns, or urban environments).

All volunteers should be trained in collecting mosquitoes with an aspirator.

Untreated volunteers should act as a control in all study designs. For measuring the CPT two untreated controls are sufficient but the results of these untreated controls cannot be compared with treated volunteers. For the relative protection (RP) more than two untreated controls are necessary. The recommended treatment area is the lower leg or the forearm of the volunteer.

Sample size: Researchers are encouraged to consult a statistician because the sample size should be large enough to give answer to the research question. The possibility of the withdrawal of participant should be taken to account when the sample size is defined. The sample size may also be affected by other factors such as experimental design, participants (age, sex) and environment (conditions, species, population density or habitats).

Duration: The repellent tests should continue long enough to assess the duration of protection provided by the specific repellent and long enough so that the efficacy failure can be measured for almost all subjects. If the repellent tests ends before the failure of the repellent the data should be „right-censored“.

Allocation: A Latin square design should be used for assessing the relative protection and testing of more than one repellent at the same time. Each subject should test each repellent and the treatments should be randomised and blinded.

5.3 Selection of the guidelines for the current study

As seen from the short summaries of the two commonly recommended guidelines and one directive there are different methods recommended and possible.

Here, I measured the CPT and the RP in the field and laboratory experiments. CPT was defined as the first landing or biting on the treated area.

I planned to carry out field experiments in two different ecological and geographical areas (Canton of Aargau and Canton of Zurich) as recommended by the WHO and the EPA guidelines. I used the method of HLC in a Latin square design with 18 volunteers.

For the laboratory experiments I used three anthropophilic mosquito species as recommended: *Ae. aegypti*, *Cx. quinquefasciatus* and *An. stephensi* for the experiments at Swiss TPH.

The mosquito test cages had a size of 40 cm per side and were filled with 200 non-blood-fed female mosquitoes. Mosquitoes were 5-10 days old for the arm-in-cage tests and were reared under standardised conditions (27 ± 2 °C, $70\pm 10\%$ relative humidity and a 12:12 (light:dark) photoperiod).

References

1. Becker N., P.D., Zgomba M., Boase C., Madon M., Dahl C., Kaiser A., *Mosquitoes and Their Control*. Second Edition ed. 2010: Springer Verlag.
2. Islam, J., et al., *Mosquito repellents: An insight into the chronological perspectives and novel discoveries*. Acta Tropica, 2017. **167**: p. 216-230.
3. Webb, C.E. and I.M.R. Hess, *A review of recommendations on the safe and effective use of topical mosquito repellents*. Public Health Research & Practice, 2016. **26**(5).
4. Moore, S.J., Mordue Luntz, A. J., Logan, J. G., *Insect bite prevention*. Infect Dis Clin North Am, 2012. **26**(3): p. 655-73.
5. Dethier, V.G., *Repellents*. Annual Review Entomology, 1956.

6. Katz, T.M., Miller, J. H., Hebert, A.A., *Insect repellents: Historical perspectives and new developments*. Journal of the American Academy of Dermatology, 2008. **58**(5): p. 865-871.
7. Moore, S.J., Debboun, M., *History of Insect Repellents*. 2008.
8. EU, *Regulation (EU) No 528/2012 of the European Parliament and of the Council of 22 May 2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products*. Official Journal of the European Union, 2012.
9. ECHA, *Practical Guide on Biocidal Products Regulation*. 2016.
10. Commission, E., *Technical Notes for Guidance: Insecticides, acaricides and products to control other arthropods (PT 18) and repellents and attractants (only concerning arthropods) (PT19)*. 2012.
11. Bundesrat, *Verordnung BAG.pdf*. 2014.
12. Logan, J.G., *Why do mosquitoes "choose" to bite some people more than others?* Outlooks on Pest Management, 2008.
13. Enserink, M., *What Mosquitoes Want: Secrets of Host Attraction*. Science, 2002. **298**(5591): p. 90-92.
14. USEPA. *Skin-Applied Repellent Ingredients*. 2017 [cited 2017 2017-08-17]; Available from: <https://www.epa.gov/insect-repellents/skin-applied-repellent-ingredients>.
15. USEPA. *Regulation of Skin-Applied Repellents*. 2017 [cited 2017 2017-08-17]; Available from: <https://www.epa.gov/insect-repellents/regulation-skin-applied-repellents>.
16. Patel, R.V., et al., *EPA-registered repellents for mosquitoes transmitting emerging viral disease*. Pharmacotherapy, 2016.
17. Heather Onyett; Canadian Paediatric Society, I.D.a.I.C. *Preventing mosquito and tick bites: A Canadian update*. 2017 30. Jan. 2017; Available from: <http://www.cps.ca/documents/position/preventing-mosquito-and-tick-bites>.
18. EPA, *Product Performance Test Guidelines*. 2010, United States Environmental Protection Agency.
19. WHO, *Guidelines for Efficacy Testing of Mosquito Repellents for Human Skin*. 2009, Geneva: World health Organization.
20. Liberati, A., et al., *The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate healthcare interventions: explanation and elaboration*. Bmj-British Medical Journal, 2009. **339**: p. 37.
21. CDC. *Insect Repellent Use & Safety*. 2015 [cited 2017 2017-09-10]; Available from: <https://www.cdc.gov/westnile/faq/repellent.html>.

22. Jamrozik, E., et al., *Ethical aspects of malaria control and research*. Malaria Journal, 2015. **14**.
23. Schonenberger, A.C., et al., *Host preferences in host-seeking and blood-fed mosquitoes in Switzerland*. Med Vet Entomol, 2016. **30**(1): p. 39-52.
24. Colucci, B., Vavassori, L., Suter, T. and Müller, P., *Vorkommen von Stechmücken im Naturwaldreservat Langholz, Kanton Aargau*. 2014.
25. Barnard, D.R., et al., *Mosquito density, biting rate and cage size effects on repellent tests*. Medical and Veterinary Entomology, 1998. **12**(1): p. 39-45.
26. Obermayr, U., A. Rose, and M. Geier, *A Novel Test Cage With an Air Ventilation System as an Alternative to Conventional Cages for the Efficacy Testing of Mosquito Repellents*. Journal of Medical Entomology, 2010. **47**(6): p. 1116-1122.
27. Schaffner F., M.A., *Spatio-temporal diversity of the mosquito fauna (Diptera: Culicidae) in Switzerland*. 2013.
28. Clements, A.N., *The Biology of Mosquitoes*. Vol. 1. 1992: Chapman and Hall. 505.
29. Fradin, M.S., *Mosquitoes and Mosquito Repellents: A Clinician's Guide*. Annales of Internal Medicine, 1998. **128**: p. 931-940.
30. Brown, M. and A.A. Hebert, *Insect repellents: An overview*. Journal of the American Academy of Dermatology, 1997. **36**(2): p. 243-249.
31. Peng, Z.K., et al., *Immune responses to mosquito saliva in 14 individuals with acute systemic allergic reactions to mosquito bites*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2004. **114**(5): p. 1189-1194.
32. Barillas-Mury, C., B. Wikel, and Y.S. Han, *Mosquito immune responses and malaria transmission: lessons from insect model systems and implications for vertebrate innate immunity and vaccine development*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2000. **30**(6): p. 429-442.
33. King, J.G. and J.F. Hillyer, *Infection-Induced Interaction between the Mosquito Circulatory and Immune Systems*. Plos Pathogens, 2012. **8**(11).
34. Anderson, R.A., J.C. Koella, and H. Hurd, *The effect of Plasmodium yoelii nigeriensis infection on the feeding persistence of Anopheles stephensi Liston throughout the sporogonic cycle*. Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences, 1999. **266**(1430): p. 1729-1733.
35. Wekesa, J.W., R.S. Copeland, and R.W. Mwangi, *Effect of Plasmodium-Falciparum on Blood Feeding-Behavior of Naturally Infected Anopheles Mosquitos in Western Kenya*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1992. **47**(4): p. 484-488.
36. Koella, J.C., L. Rieu, and R.E.L. Paul, *Stage-specific manipulation of a mosquito's host-seeking behavior by the malaria parasite Plasmodium gallinaceum*. Behavioral Ecology, 2002. **13**(6): p. 816-820.

37. VectorBase. *Anopheles stephensi*. 2017 [cited 2017 2017-09-04]; Available from: **<https://www.vectorbase.org/organisms/anopheles-stephensi>**.
38. CDC. *Anopheles Mosquitoes*. 2015 October 21, 2015 [cited 2017 2017-09-04]; Available from: **<https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/mosquitoes/index.html>**.
39. Sparks, J.T. and J.C. Dickens, *Electrophysiological Responses of Gustatory Receptor Neurons on the Labella of the Common Malaria Mosquito, Anopheles quadrimaculatus (Diptera: Culicidae)*. J Med Entomol, 2016.
40. ECDC. *Aedes aegypti - Factsheet for experts* 2017 [cited 2017 2017-09-04]; Available from: **<https://ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/facts/mosquito-factsheets/aedes-aegypti>**.
41. VectorBase. *Aedes aegypti*. 2017 [cited 2017 2017-09-04]; Available from: **<https://www.vectorbase.org/organisms/aedes-aegypti>**.
42. Tomasello, D. and P. Schlagenhauf, *Chikungunya and dengue autochthonous cases in Europe, 2007-2012*. Travel Med Infect Dis, 2013. **11**(5): p. 274-84.
43. La Ruche, G., et al., *First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010*. Euro Surveill, 2010. **15**(39): p. 19676.
44. VectorBase. *Culex quinquefasciatus*. 2017 [cited 2017 2017-09-04]; Available from: **<https://www.vectorbase.org/organisms/culex-quinquefasciatus>**.
45. Sardelis, M.R., Turell, M. J., Dohm, D. J. and O'Guinn, M. L., *Vector Competence of Selected North American Culex and Coquillettidia Mosquitoes for West Nile Virus*. Emerging Infectious Diseases, 2001. **7**.
46. Briegel, H., A. Waltert, and A.R. Kuhn, *Reproductive physiology of Aedes (Aedimorphus) vexans (Diptera: Culicidae) in relation to flight potential*. J Med Entomol, 2001. **38**(4): p. 557-65.
47. ECDC. *Anopheles plumbeus - Factsheet for experts*. 2014 21 Aug 2014 [cited 2017 2017-09-16]; Available from: **<https://ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/facts/mosquito-factsheets/anopheles-plumbeus>**.
48. Reiter, P., *Yellow fever and dengue: a threat to Europe?* Euro Surveill, 2010. **15**(10): p. 19509.
49. Kurolt, I.C., et al., *Molecular characterization of dengue virus 1 from autochthonous dengue fever cases in Croatia*. Clin Microbiol Infect, 2013. **19**(3): p. E163-5.
50. Gjenero-Morgan, I.A.B., Krajcar D., Lesnikar, V., Klobucar, A., Prem-Novosel, I. et al., *Autochthonous dengue fever in Croatia, August-September 2010*, in *Euro Surveillance: bulletin européen sur les maladies transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*. 2011.

51. Angelini, R., et al., *An outbreak of chikungunya fever in the province of Ravenna, Italy*. Euro Surveill, 2007. **12**(9): p. E070906 1.
52. Rezza, G., et al., *Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region*. Lancet, 2007. **370**(9602): p. 1840-6.
53. Lourenco, J. and M. Recker, *The 2012 Madeira dengue outbreak: epidemiological determinants and future epidemic potential*. PLoS Negl Trop Dis, 2014. **8**(8): p. e3083.
54. Almanzor, B.L., H.T. Ho, and T.M. Carvajal, *Ecdysis period and rate deviations of dengue mosquito vector, Aedes aegypti reared in different artificial water-holding containers*. J Vector Borne Dis, 2016. **53**(1): p. 37-45.
55. Yakob, L., et al., *Aedes aegypti Control Through Modernized, Integrated Vector Management*. PLoS Curr, 2017. **9**.
56. Severson, D.W. and S.K. Behura, *Genome Investigations of Vector Competence in Aedes aegypti to Inform Novel Arbovirus Disease Control Approaches*. Insects, 2016. **7**(4).
57. Montgomery, B.L., et al., *Rapid Surveillance for Vector Presence (RSVP): Development of a novel system for detecting Aedes aegypti and Aedes albopictus*. PLoS Negl Trop Dis, 2017. **11**(3): p. e0005505.
58. Setha, T., et al., *Bacterial Larvicide, Bacillus thuringiensis israelensis Strain AM 65-52 Water Dispersible Granule Formulation Impacts Both Dengue Vector, Aedes aegypti (L.) Population Density and Disease Transmission in Cambodia*. PLoS Negl Trop Dis, 2016. **10**(9): p. e0004973.
59. Deming, R., et al., *Spatial variation of insecticide resistance in the dengue vector Aedes aegypti presents unique vector control challenges*. Parasit Vectors, 2016. **9**: p. 67.
60. Miller, P., *Avoiding the bite: update on DEET*. 2004.
61. Thrower, Y. and L.I. Goodyer, *Application of insect repellents by travelers to malaria endemic areas*. Journal of Travel Medicine, 2006. **13**(4): p. 198-202.
62. Moore, S.J., A.J. Mordue, and J.G. Logan, *Insect Bite Prevention*. Infectious Disease Clinics of North America, 2012. **26**(3): p. 655-+.
63. Reifenrath, W.G., Hawkins, G. S. and Kurtz, M. S., *Evaporation and Skin Penetration Characteristics of Mosquito Repellent Formulations*. Journal of the American Mosquito Control Association 1989. **5** (1).
64. Moore, S.J., RITAM Vector Control Group, *Guidelines for Studies on Plant-Based Insect Repellents*. 2004.

65. Spencer, T.S., Stanton, R., Gabel, M.L. and Akers, W. A., *Automated Instrumentation to Measure Evaporation Rates of Repellents*. Mosquito News, 1976. **36 (4)**: p. 418-424.
66. Khan, A.A., Maibach, H. I. and Skidmore, D. L., *Insect Repellents: Effect of Mosquito and Repellent-related Factors on Protection Time*. Journal of Economic Entomology, 1975. **68 (1)**.
67. Khan, A.A., Maibach, H. I. and Skidmore, D. L., *Addition of perfume fixatives to mosquito repellents to increase protection time*. Mosquito News, 1975. **35 (1)**.
68. Fradin, M.S., *Mosquitoes and mosquito repellents: A clinician's guide*. Annals of Internal Medicine, 1998. **128(11)**: p. 931-940.
69. Schoepke, A., Steffen R. and Gratz, N., *Effectiveness of personal Protection Measures against Mosquito Bites for Malaria Prophylaxis in Travelers*. Journal of Travel Medicine, 1998. **5**: p. 188-192.
70. Virk, A., *Medical Advice for International Travelers*. Mayo Clinic Proceedings, 2001. **76(8)**: p. 831-840.
71. Elston, D.M., *Prevention of arthropod-related disease*. Journal of the American Academy of Dermatology, 2004. **51(6)**: p. 947-954.
72. Gertler, S.I., *N, N-Diethylbenzamide as an insect repellent*, U.S.P. Office, Editor. 1946: United States of America.
73. Collins, D.A.a.B., J.N., *Assessment of the Efficacy of Quwenling as a Mosquito Repellent*. Phytotherapy Research, 1993. **7(17-20)**.
74. Debboun, M., Strickman D.A. and Klun, J.A., *Repellents and the Military: Our First Line of Defence*. 2005, MDtravelhealth.com.
75. Frances, S.P. and R.A. Wirtz, *Repellents: Past, present, and future*. Journal of the American Mosquito Control Association, 2005. **21(4)**: p. 1-3.
76. Miller, P., *Avoiding the bite: update on DEET*, in *CPJ/RPC*. 2004.
77. Rutledge, L.C., et al., *Comparative Sensitivity of Mosquito Species and Strains to Repellent Diethyl Toluamide*. Journal of Medical Entomology, 1978. **14(5)**: p. 536-541.
78. Fradin, M.S. and J.F. Day, *Comparative efficacy of insect repellents against mosquito bites*. N Engl J Med, 2002. **347(1)**: p. 13-8.
79. Koren, G., D. Matsui, and B. Bailey, *DEET-based insect repellants: safety implications for children and pregnant and lactating women*. (vol 169, pg 209, 2003). Canadian Medical Association Journal, 2003. **169(4)**: p. 283-283.
80. Novak, R.J., Gerberg, E.J, *Natural-based Repellent Products: Efficacy for Military and General Public Uses*. Journal of the American Mosquito Control Association, 2005. **21(4)** (Supplement:7-11).

81. Sudakin, D.L., Trevathan, W. R., *DEET: A Review and Update of Safety and Risk in the General Population*. Journal of Toxicology, 2003. **41**: p. 831-839.
82. Koren, G., Matsui, D. and Bailey, B., *DEET-based insect repellents: safety implications for children and pregnant and lactating women*. Canadian Medical Association Journal, 2003. **169** (3).
83. McGready, R., Hamilton, K. A., Simpson, J. A., Cho, T., Luxemburger, C., Edwards, R., Looareesuwan, S., White, N. J., Nosten, F., and Lindsay S. W., *Safety of the Insect Repellent N, N-Diethyl-M-Toluamide (DEET) in Pregnancy*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 2001. **65** (4): p. 285-289.
84. CDC. *Biomonitoring Summary, N,N-Diethyl-meta-toluamide (DEET)*. 2017 23.12.2016 [cited 2017 2.7.2017]; Available from: **https://www.cdc.gov/biomonitoring/DEET_BiomonitoringSummary.html**.
85. McGready, R., et al., *Safety of the insect repellent N,N-diethyl-M-toluamide (DEET) in pregnancy*. Am J Trop Med Hyg, 2001. **65**(4): p. 285-9.
86. CDC. *Centers for Disease Control and Prevention*. 2016 [cited 2016; Available from: **<https://www.cdc.gov/>**.
87. Moore, S.J., Debboun, M., *History of Insect Repellents*. 2006.
88. Moore, S.J., and Lenglet, A.D., *An Overview of Plants Used as Insect Repellents*, in *Traditional Medicinal Plants and Malaria*. 2004, CRC Press LLC. p. 347.
89. Maia, M.F., Moore, S. J., *Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing*. Malar Journal, 2011. **10 Suppl 1**: p. S11.
90. Trongtokit, Y., Curtis, C. F. and Rongsriyam, Y., *Efficacy of repellent products against cages and free flying Anopheles stephensi mosquitoes*. South East Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, 2006. **36** (6).
91. Uzzan, B., et al., *Efficacy of four insect repellents against mosquito bites: a double-blind randomized placebo-controlled field study in Senegal*. Fundamental & Clinical Pharmacology, 2009. **23**(5): p. 589-594.
92. Carroll, S.P. and J. Loye, *PMD, a registered botanical mosquito repellent with deet-like efficacy*. J.Am.Mosq.Control Assoc., 2006. **22**(3): p. 507-514.
93. Trigg, J.K., *Evaluation of a eucalyptus-based repellent against Anopheles spp. in Tanzania*. J Am Mosq Control Assoc, 1996. **12**(2 Pt 1): p. 243-6.
94. Tawatsin, A., Asavadachanukorn, P., Thavara, U., Wongsinkongman, P., Bansidhi, J. Boonruad, T., Chavalittumrong, P., Soonthornchareonnon, N., Komalamisra, N. and Mulla, M.S., *Repellency of Essential Oils Extracted from Plant in Thailand against four Mosquito Vectors (Diptera: Culicidae) and Oviposition Deterrent Effects against Aedes aegypti (Diptera: Culicidae)*. South East Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, 2005. **37** (5): p. 915-931.

95. Naucke, T.J., et al., *Field evaluation of the efficacy of proprietary repellent formulations with IR3535((R)) and Picaridin against Aedes aegypti*. Parasitology Research, 2007. **101**(1): p. 169-177.
96. WHO, *Ethyl Butylacetylaminopropionate, also known as IR3535*. 2006. p. 1-25.

Chapter 2

Comparison of field and laboratory efficacy studies of topical repellents – a systematic review



Topical mosquito repellents

Comparison of field and laboratory efficacy studies of topical repellents – a systematic review

Barbara Colucci ^{1,2,*} Sarah J. Moore ^{1,2,3} and Pie Müller ^{1,2 *}

¹Department of Epidemiology and Public Health, Swiss Tropical and Public Health Institute, Socinstrasse 57, PO Box, 4002 Basel, Switzerland

²University of Basel, Petersplatz 1, 4003 Basel, Switzerland

³Ifakara Health Research and Development Centre, PO Box 53, Ifakara, Kilombero, Tanzania

* Corresponding author

pie.mueller@swisstph.ch

E-Mail addresses

BC: barbara.colucci@swisstph.ch

SJM: smoore@ihi.or.tz

PM: pie.mueller@swisstph.ch

Abstract

Travellers to endemic areas are at risk to get infected by mosquito transmitted diseases such as malaria, dengue fever, West-Nile fever, chikungunya fever, filariasis or Zika. The

use of topical repellents is highly recommended to avoid mosquito bites and appropriate clothing is essential. Studies with data of one of the four most commonly used active ingredients (AI) of topical repellent products are presented in this review. On the market available mosquito repellents are usually tested by the producer company under laboratory conditions and four of the most effective active ingredients are DEET, Icaridin, EBAAP and PMD but how long lasts the protection in the field compared to data gained in the laboratory? This systematic review presents all available data of the four repellents recommended by the Centers for Diseases Control and Prevention (CDC) [1]. Following the guidelines of PRISMA [2] a total of 36 publications fulfilled the inclusion criteria. Only eight comparative studies with field and laboratory experiments in humans were found. Fifteen studies were performed in the laboratory and thirteen were field trials with the human landing catch method whereas the number and the position of the study participants, residence time of the repellent before the experiments started, exposition time in the field and rotation of the subjects during the experiment was extremely variable what influenced the comparability of the results. The eight comparative field and laboratory studies showed extremely variable designs and there was a weak correlation between protection times measured in laboratory experiments and field trials. The analyses of the laboratory methods showed inconsistency as well. The number of mosquitoes per cage, cages sizes, age of the mosquitoes or the number of participants and their sex or the definition of the endpoint (relative/complete protection) were diverse. Protection times of laboratory experiments and field trials are difficult to compare due to the low number of studies and different experimental designs. In general it can be stated that repellents that protected well in the laboratory experiments showed a good protection in the field as well.

Keywords: Travel Medicine, Biocides, European Union

Introduction

Biting mosquitoes (Diptera, Culicidae) are causing serious health problems in tropical and subtropical areas because they are vectors of several infectious diseases such as malaria, filariasis, dengue fever, West-Nile fever, chikungunya fever or Zika virus infections. Not only the populations in endemic areas are affected but also travellers to those destinations are at risk. For many of the mosquito-borne diseases neither a vaccination nor a specific treatment is available and, therefore, travellers are advised to protect themselves from mosquito bites. Even in the absence of pathogens mosquitoes are a serious nuisance, preventing people from staying outdoors, and bites may lead to itching, skin irritations, pain, allergic reactions or serious secondary infections.

To avoid mosquito bites travellers are advised to use topical repellents [3, 4]. Topical repellents are applied directly on the skin or clothing, and are available in various formulations such as oils, lotions, sprays or creams [5]. The formulations contain active ingredients that disrupt the host-seeking behaviour of mosquitoes, driving or keeping them away from the treated human skin [6, 7]. Upon application on the skin the body heat evaporates the actives which then form a vapour barrier preventing mosquitoes from coming near the treated area [8, 9].

The Centers for Disease Control and Prevention (CDC) [1] and the US EPA [10, 11] recommend the use of topical repellents, containing one of the following active ingredients (AIs): DEET, Icaridin, Oil of lemon eucalyptus (OLE) or PMD and EBAAP (Table 1).

In line with the CDC recommendations DEET, Icaridin, OLE or PMD and EBAAP are also recommended by professionals in other countries, including the Canada and Australia [12, 13]. These active ingredients typically provide sufficient protection against mosquito bites, depending on concentration and formulation [14]. The above AIs may be split into two groups; conventional AIs that are synthetic chemicals, including DEET and Icaridin, and naturally derived but may also be produced synthetically today, comprising OLE, PMD and

EBAAP.

The four most commonly used active ingredients in mosquito repellent products

Table 1: Chemical names and synonyms of recommended topical mosquito repellents

Common name	Chemical name	Synonyms
DEET	N,N-diethyl-m-toluamide or N,N-diethyl-3-methylbenzamide	
Icaridin	2-(2-hydroxyethyl)-1-piperidinecarboxylic acid 1-methylpropyl ester)	KBR 3023, picaridin
PMD	para-menthane-3,8-diol	Oil of lemon eucalyptus (OLE)
EBAAP	3-[N-butyl-N-acetyl]-aminopropionic acid, ethyl ester	IR3535

DEET

DEET was discovered during the 1940s in the quest for a mosquito repellent for the US Army and came to market in 1956 [15, 16]. DEET is a recommended repellent by the World Health Organization (WHO) [17] and often regarded as the “gold standard”. Indeed, it still remains one of the most effective mosquito repellents [18-24]. However, a drawback is DEET’s property as a solvent of certain plastics causing damage to wrist bands, fabrics and other synthetic items that come into contact, for example, with the treated skin [25]. Concerns have been raised over its safety following reports of potential DEET-associated adverse events, including ataxia, respiratory depression, coma and seizures in infants [26]. However, reported events are still extremely rare and a study in pregnant women found no adverse effects when using DEET in the 2nd trimester [27-29].

Another conventional repellent, registered 2001 in the United States, is Icaridin. Icaridin is an odour- and colourless AI that protects the user against mosquitoes, biting flies and ticks [30]. In contrast to DEET, Icaridin does not damage plastics or synthetic fabrics [19, 31] yet

showed to be less effective than DEET against African malaria vectors [32].

PMD

Chemical name of PMD is *para*-Menthane-3,8-diol and is derived from the extract of the lemon eucalyptus, *Corymbia citriodora* (synonyms include *Eucalyptus citriodora* and *E. maculate* var. *citriodora*) from China. The Chinese name of PMD is “Quwenling” and means “effective repeller of mosquitoes” [33, 34]. It was discovered in the 1960’s [35]. Today, PMD is chemically synthesized for mosquito repellents. PMD 20% showed protection for 7-8 hours in the laboratory experiments of Trongtoit *et al.* [36] and showed similar protection times as DEET in the studies of Uzzan *et al.* [37], Carroll *et al.* [38] and Trigg [39].

EBAAP

EBAAP, a moderately volatile insect repellent, was developed in the 1970s and is based on the amino acid α -alanine and can be found in several products sold in Europe for more than 20 years [40]. The AI is not patented and has no ISO common name. The main hazards of EBAAP relate to eye and skin irritation but the skin irritation observed in animal experiments were mild. There were no skin irritations reported in humans and eye irritations can be prevented and the risks for its use as a mosquito repellent have been deemed acceptable by the World Health Organization (WHO). EBAAP can be used as insect repellent on the skin as well as sprayed on clothing to repel mosquitoes [17].

The following three active ingredients are available in one till three products [10].

- 2-Undecanone
- Catnip oil: *Nepeta cataria* or catmint
- Oil of citronella.

Several products exist on the market but none is registered by the US EPA equally to citronella, cedar, geranium, peppermint or soybean oil. Products containing these active ingredients have not been evaluated for their effectiveness but show minimal risk to human health at the percentages found in available products on the market [41].

In addition to the type of AI the efficacy of a repellent product also depends on the concentration of the AI. In general, the higher the concentration the longer the protection time [42]. However, other factors may also influence the protection time of a mosquito repellent such as its formulation (e.g. cream, spray, added perfumes or fixatives) or the biting behaviour of the mosquitoes [43, 44]. As a consequence, each repellent product requires individual evaluation of its efficacy against mosquito bites. Careful efficacy evaluation is particularly important since the protection time on the label can be an important criterion for a consumer to choose one product over another, while protection time is also the basis for the evaluation of human toxicity and exposure. Topical repellents are primarily, or exclusively, evaluated under laboratory conditions, following various test protocols [17, 45-47]. These protocols typically involve a cage containing hungry female mosquitoes into which a study participant exposes a forearm for a few minutes following application of the repellent on the skin. The procedure is then repeated at regular intervals (e.g. 30 minutes or hourly) until failure of the repellent. On that basis an average protection time for that product is estimated. The so called arm-in-cage test raises the question as to what the predictive value of such laboratory studies is and how informative label claims based on these studies are for the consumer.

In this review we set out to search for published data on laboratory and field studies, measuring the protection times of DEET, Icaridin, OLE/PMD and EBAAP in order to shed light on the relationship between protection times measured under laboratory and field conditions in order to critically assess the meaning of current label claims on topical repellents for the end user.

Methods

The current review follows the PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) statement [2].

Search strategy

Six literature data bases were queried with the English terms “mosquito repellent” and “mosquito repellents” for articles published between 1956, when the first mosquito repellent (i.e. DEET) came to market [16], and December 2016. These data bases included PubMed, ISI Web of Science, ScienceDirect, Cochrane library, LILACS and the Armed Forces Pest Management Board Literature Retrieval System (no open access anymore). In addition to the journal articles, the reference lists in the identified articles were searched.

Inclusion and exclusion criteria

In the analysis only studies that met the following criteria were included: 1) The study reports on repellents against biting mosquitoes; 2) the repellents were tested in humans; 3) the tested repellents contained DEET, Icaridin, OLE, PMD or EBAAP; and the study reports the protection time, either as complete protection time (CPT) or as relative protection (%R). Studies that do not state the applied dosage, tested mixed formulations, are reviews without original data were excluded.

Data analysis

First, a data base with all identified literature was generated in Endnote X7.1.1 (Thomson Reuters). After reviewing all duplicates each article was verified against the inclusion and exclusion criteria before data were extracted and captured in a standardised Microsoft Excel 2010 spread sheet.

The studies the following information was extracted and split into three tables:

- 1) For laboratory experiments: Active ingredient, test method and cage size, number and age of mosquitoes, mosquito species, number of the study participants, protection time, results and author of the publication.
- 2) For combined field and laboratory studies: amount of applied repellent, mosquito species, number of participants, protection time, active ingredient, cage size, number of mosquitoes, results of laboratory vs. field, author of the publication.
- 3) For laboratory experiments: active ingredient, method, amount of repellent, number of study participants, protection time, results, author of the publication.

In order to graphically represent the outcomes of the reviewed studies the protection time was plotted against the application rate. The application rate was estimated on the basis of the mentioned applied volume per skin area and the reported percentage active ingredient in the formulation. Depending on the type of data the protection time is either given as complete protection time as or 95% relative protection time. The absolute protection time corresponds to the duration upon repellent application until the first, confirmed bite or first bite if a second bite was not measured in the study. The 95% relative protection time is the time span during which the relative protection remained above or at 95% as compared to the untreated body part. In order to identify trends in the data, linear regression lines were computed, while the data points were weighed according to the number of study participants in the respective study. Statistical analysis was performed in the open source statistical package R version 3.4.1 [48], while the graphs were produced with the R package “ggplot2” [49].

Results and Discussion

General observations

The number of participants was quite low in the analysed publications with field and laboratory experiments. Laboratory studies conducted with 6-8 participants [36, 50-58] or not clearly mentioned in two studies [36, 59] were common and the individual differences between the subjects probably influenced the protection time more than the repellent itself. Of the thirteen analysed field experiments were just two studies [37, 60] that tested with twelve or more volunteers. Additionally, the number of participating males and females was just in two [50, 52] of 15 laboratory studies balanced. It was extremely difficult to predict protection times in the field experiment based on data gained in laboratory experiments even with standardized conditions. The experimental designs were hard to compare. During laboratory studies landing rates and bite pressure were extremely high compared to field conditions. The amount of a product in a repellent test is recommended by the WHO and should be 1ml per 600 cm² [17]. This rate is under discussion because end users tend to use less but to get comparable protection times of a repellent provided by different laboratories a standard dosage per cm² is essential.

A total of 6,416 articles were identified, while 36 publications fulfilled the eligibility requirements for inclusion in the systematic review (Figure 1). From those studies, 8 report laboratory-field comparisons, 15 present laboratory experiments and 13 document field studies.

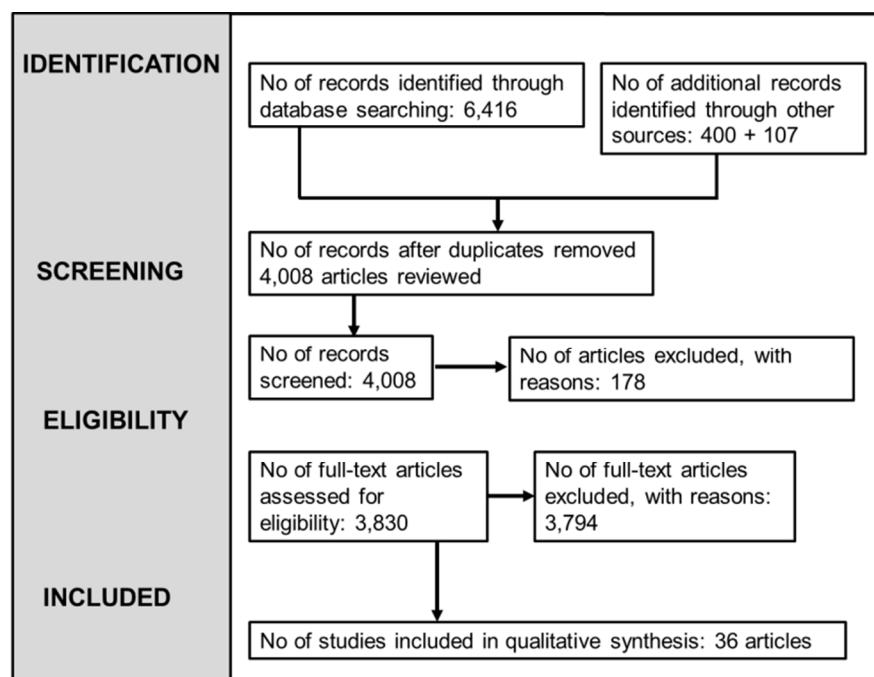


Figure 1: Flow diagram showing the PRISMA selection procedure of articles included in the systematic review.

Many of the studies were excluded from the analysis because the amount or concentration of the active ingredient was not mentioned, repellents were tested on animals, repellent mixtures were used or there was no protection time reported.

Three tables with the 36 analysed studies are in the supplementary files.

Table 2: Explanation of short terms in the three tables

CPT ¹ : first landing or bite on a treated arm
CPT ² : Time till third bite
CPT ³ : Time till first bite
CPT ⁴ : Time till first (and second bite)
CPT ⁵ : Time till first confirmed bite
%R ¹ = Protection time/% biting; %Biting = number of bites/250x100
%R ⁶ : Repellency = ((C – T) / C)x100 where C is the number of mosquitoes collected from control areas and T is the number collected mosquitoes from the treated areas
%R ⁷ : (Mehr et al. 1985)
%R ² : Landing of mosquitoes: (count treated/count untreated) declined below 95%
CPT ⁶ : 2 or more mosquitoes landing on the barrier screen (>5 consecutive seconds) or a clear evidence of probing behaviour that occurred in that same 5-sec

Active ingredients

In 17 studies the efficacy of commercial products was evaluated [36-38, 50, 51, 56, 59, 61-71] that contained perfumes, fixatives or other ingredients, potentially influencing the mosquitoes' biting behaviour; and hence made a comparison between protection times almost impossible [72, 73]. Data on DEET, PMD, EBAAP and Icaridin in ethanolic solutions were rare but available from [40, 52-55, 57, 58, 60, 74-80], whereas DEET was often included as a positive control at a concentration of 20%; and hence most data are available on DEET, followed by EBAAP, Icaridin and OLE/PMD. The recommended amount of repellent per forearm or lower leg stated in the WHO [17] as well as in the US EPA [46] is 1 ml per 600 cm² area.

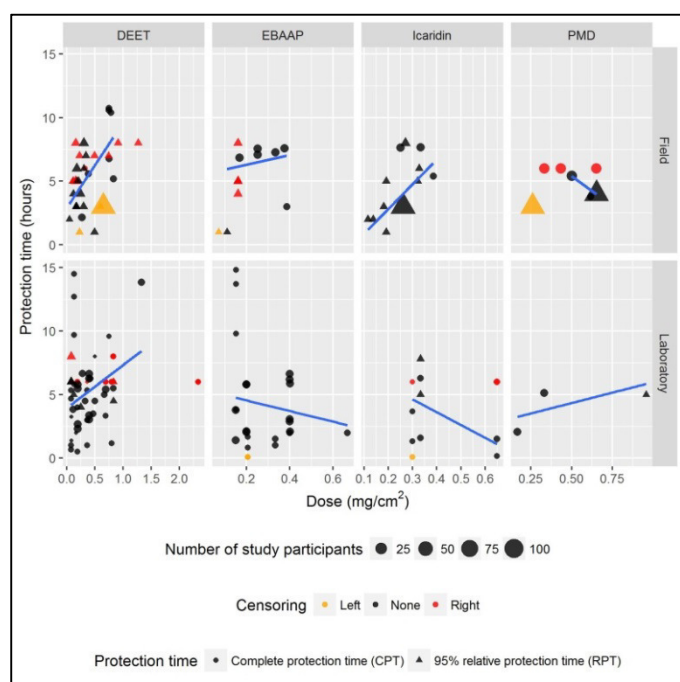


Figure 2: Protection time as a function of application rate. Each symbol represents the average protection time of a single experiment. The complete protection time (CPT) refers to the time elapsed between application and the first confirmed bite, or the first bite if no confirmatory bite was recorded. The 95% relative protection time (RPT) is the duration during which the relative protection, as compared to the untreated skin, remained at or above 95%. In many studies the data were censored, that is the study was concluded before the CPT or 95% RPT were reached. In a few cases the data were also left censored, meaning that at the first measurement the formulation already failed without knowing at what point it might have failed. The size of the symbols represents the number of study participants; and hence replicates were included in the study. The blue line show tentative linear relationships between the application rate and the protection time. The data points for estimating the regression

line were weighed against the number of study participants. Moreover, censored data were ignored for the calculation of the regression lines.

Outcome measures

The reported outcome measures were generally the relative protection %p or the complete protection time (CPT). The CPT is defined as the time after application till the first landing/biting of a mosquito on the treated area and %p was determined as:

$$\%p = \frac{C-T}{C} \times 100$$

Where T was the average number of mosquitoes landing on the treated surface per second in a test and C is the average number of mosquitoes landing on the surface treated with the negative control.

Both in the field and laboratory studies the efficacy of a repellent was mostly estimated by the human landing catch (HLC) method, whereby the number of mosquitoes landing on the treated versus the number of landings on the untreated skin were compared to first compute the relative protection (%R). %R is a useful tool in view to the strong influence of the biting pressure and number of mosquitoes in the study area. Some studies [38, 40, 64, 71, 78, 81] used the complete protection time whereas the definition of the endpoint varied.

Study participants

The number of study participants varied from 1 [38, 63, 66] to 100 [37] but was generally between 2 [64, 66, 76-78] and 6 participants [50, 51, 53-58, 63, 64, 67-69, 81, 82]. Some studies tested repellents with male volunteers only e.g. [60, 68, 69, 81].

Test mosquito species

The dominant mosquito species in the laboratory experiments was *Ae. aegypti*. Only 1 of 24

experiments was conducted with *An. stephensi* and 8 of 23 experiments presented protection times for *Cx. quinquefasciatus*. Not surprisingly, the variability of mosquito species in the field was much larger.

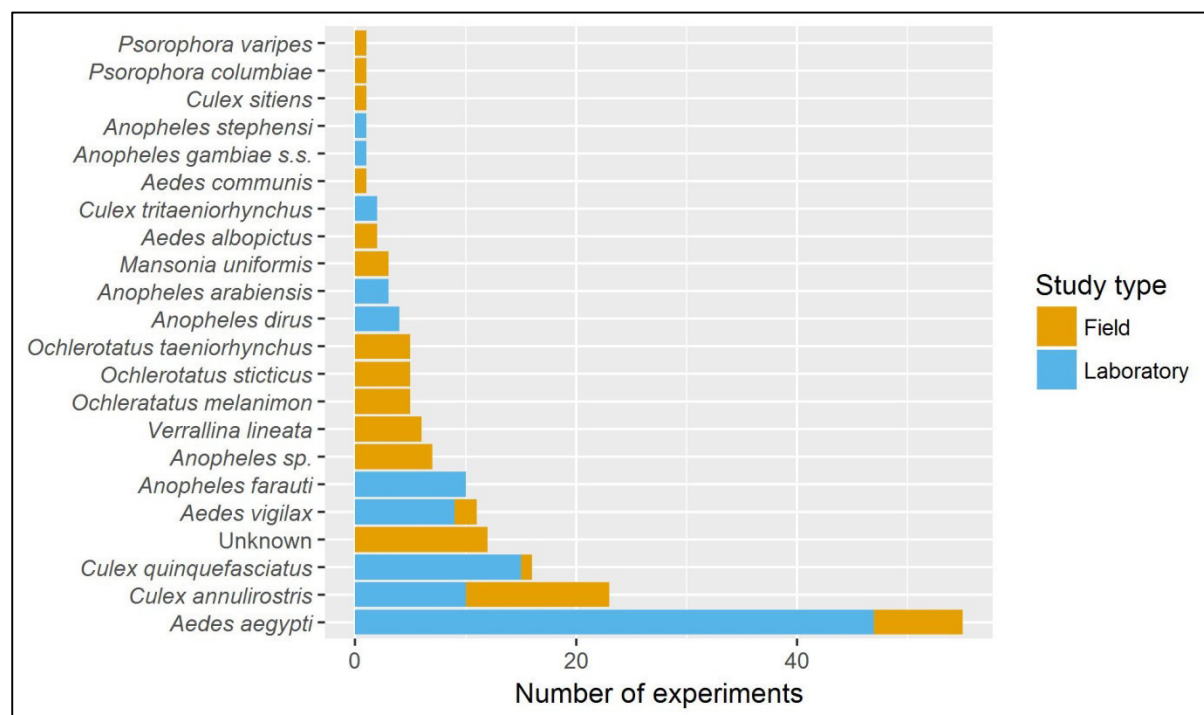


Figure 3: Frequency of mosquito species included in the reviewed studies. For the field studies, either the most common species is shown or the species that were explicitly evaluated in a particular study. “Unknown” means that there was no information available on the mosquito species.

Analysis of laboratory studies

With a few exceptions most studies used the so called arm-in-cage test. However, the cage sizes varied considerable as well as the number and age of the mosquitoes in the cages. Three different definitions of the complete protection time and relative protection were mentioned in the fifteen analysed laboratory studies. The complete protection time was measured from the time of repellent application till first, second or third bite/landing of a mosquito. The exposed arm area and the amount of the repellent used for testing varied extremely in the different study designs.

Laboratory studies methods

Measuring mosquito repellent efficacy with all the different cage sizes and numbers of mosquitoes per cage made a comparison of protection times against the different mosquito species extremely difficult. Mosquitoes in these laboratory experiments had different ages and the definitions of the endpoint (CPT) varied as well. The sample size in both field and laboratory experiments was extremely low in many of the analysed studies. How can these data predict the protection of a repellent under field conditions?

The influence of the cages sizes is important as the study of Barnard et al. [83] showed and the guidelines of the WHO [17] clearly recommend a size of 40-45 cm per side whereas only five [38, 55, 56, 62, 75] of 23 studies used cages with the recommended size.

Field experiments

The human landing catch is still the “gold standard” to test mosquito repellents in the field. All studies with human landing catches had a mosquito bite as endpoint and participating volunteers had to collect all mosquitoes from their treated limb. This method is in many countries no longer acceptable and ethical clearance cannot be achieved anymore because of the health risk for the volunteer. As WHO [17] and US EPA [46] guidelines also allow collecting landing mosquitoes it would be much safer for the volunteers to not wait till mosquitoes bite in order to avoid any kind of parasite transmission. In field trials the present mosquito population was used in the study areas and this was always a mixture of several different mosquito species. Different mosquito species were collected during the analysed field experiments but not all of them preferred humans as their favourite host and therefore traps can give a better overview of the present mosquito population in a specific area at a certain time period. Mosquito populations vary in all the different countries and not all of them were refused in the same way by the various mosquito repellents. The biting pressure in different parts of the world was extremely variable and therefore a relative protection time was usually measured.

Conclusions

Arm-in-cage tests carried out in laboratories with standardized conditions should be conducted in the same way and this concerns the amount of the repellent per arm area, the number of mosquitoes per cage and the age of the mosquitoes. Guidelines of the WHO [17] already exist and they recommend a cage size of 35-40 cm per side, 1 ml of the repellent per 600 cm² arm area and an age of 5-7 days of the involved test mosquitoes. The active ingredient should be tested on ethanol base only without any other ingredients. The WHO guidelines recommend measuring the CPT from the time after application till the first landing/probing of a mosquito on the treated area. Field studies should always measure a complete and a relative protection due to the differences in biting pressure and environmental influences. Repellents that showed good protection under laboratory conditions were also effective in the field experiment.

Acknowledgements

The authors thank Stefanie Strauch from the Swiss Federal Office of Public Health for the pleasant collaboration and continuous support. We would also like to thank the Vector Control Group at Swiss TPH for the continuous support.

References

1. CDC. *Centers for Disease Control and Prevention*. 2016 [cited 2016; Available from: <https://www.cdc.gov/>].
2. Liberati, A., et al., *The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate healthcare interventions: explanation and elaboration*. *Bmj-British Medical Journal*, 2009. **339**: p. 37.
3. Moore, S.J., A.J. Mordue, and J.G. Logan, *Insect Bite Prevention*. *Infectious Disease Clinics of North America*, 2012. **26**(3): p. 655-+.

4. Elston, D.M., *Prevention of arthropod-related disease*. Journal of the American Academy of Dermatology, 2004. **51**(6): p. 947-954.
5. Fradin, M.S., *Mosquitoes and mosquito repellents: A clinician's guide*. Annals of Internal Medicine, 1998. **128**(11): p. 931-940.
6. Dethier, V.G., *Repellents*. Annual Review Entomology, 1956.
7. Frances, S.P., Wirtz, R.A., *Repellents: Past, Present, and Future*. Journal of the American Mosquito Control Association, 2005. **21** (4)(Supplement: 1-3).
8. Smith, C.N., Gilbert, I.H., Gouck, H.K., Bowman, M.C., Agree, F. Jr., and Schmidt, C.H., *Factors Affecting the Protection Period of Mosquito Repellents Technical*. 1963, Agricultural Research Service UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE.
9. Feldmann, R.J. and H.I. Maibach, *Absorption of some organic compounds through the skin in man*. J Invest Dermatol, 1970. **54**(5): p. 399-404.
10. US_EPA. *Skin-Applied Repellent Ingredients*. 2017 [cited 2017 2017-08-17]; Available from: **<https://www.epa.gov/insect-repellents/skin-applied-repellent-ingredients>**.
11. Patel, R.V., et al., *EPA-registered repellents for mosquitoes transmitting emerging viral disease*. Pharmacotherapy, 2016.
12. Government, A. *Active constituents*. 2015 [cited 2017 2.7.2017]; Available from: **<https://apvma.gov.au/node/10696>**.
13. Heather Onyett; Canadian Paediatric Society, I.D.a.I.C. *Preventing mosquito and tick bites: A Canadian update*. 2017 30. Jan. 2017; Available from: **<http://www.cps.ca/documents/position/preventing-mosquito-and-tick-bites>**.
14. Mutebi, J.-P., Hawley, W. A., Brogdon, W. G. *Protection against Mosquitoes, Ticks, & Other Arthropods*. 2017 31.5.2017 [cited 2017 2.7.2017]; Available from: **<https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2018/the-pre-travel-consultation/protection-against-mosquitoes-ticks-other-arthropods>**.
15. Gertler, S.I., *N, N-Diethylbenzamide as an insect repellent*, U.S.P. Office, Editor. 1946: United States of America.
16. Brown, M. and A.A. Hebert, *Insect repellents: An overview*. Journal of the American Academy of Dermatology, 1997. **36**(2): p. 243-249.
17. WHO, *Guidelines for Efficacy Testing of Mosquito Repellents for Human Skin*. 2009, Geneva: World health Organization.
18. Collins, D.A.a.B., J.N., *Assessment of the Efficacy of Quwenling as a Mosquito Repellent*. Phytotherapy Research, 1993. **7**(17-20).

19. Katz, T.M., Miller, J. H., Hebert, A.A., *Insect repellents: Historical perspectives and new developments*. Journal of the American Academy of Dermatology, 2008. **58**(5): p. 865-871.
20. Debboun, M., Strickman D.A. and Klun, J.A., *Repellents and the Military: Our First Line of Defence*. 2005, MDtravelhealth.com.
21. Frances, S.P. and R.A. Wirtz, *Repellents: Past, present, and future*. Journal of the American Mosquito Control Association, 2005. **21**(4): p. 1-3.
22. Miller, P., *Avoiding the bite: update on DEET*, in *CPJ/RPC*. 2004.
23. Rutledge, L.C., et al., *Comparative Sensitivity of Mosquito Species and Strains to Repellent Diethyl Toluamide*. Journal of Medical Entomology, 1978. **14**(5): p. 536-541.
24. Novak, R.J. and E.J. Gerberg, *Natural-based repellent products: Efficacy for military and general public uses*. Journal of the American Mosquito Control Association, 2005. **21**(4): p. 7-11.
25. Sudakin, D.L. and W.R. Trevathan, *DEET: A review and update of safety and risk in the general population*. Journal of Toxicology-Clinical Toxicology, 2003. **41**(6): p. 831-839.
26. Sudakin, D.L., Trevathan, W. R., *DEET: A Review and Update of Safety and Risk in the General Population*. Journal of Toxicology, 2003. **41**: p. 831-839.
27. Koren, G., Matsui, D. and Bailey, B., *DEET-based insect repellents: safety implications for children and pregnant and lactating women*. Canadian Medical Association Journal, 2003. **169** (3).
28. McGready, R., Hamilton, K. A., Simpson, J. A., Cho, T., Luxemburger, C., Edwards, R., Looareesuwan, S., White, N. J., Nosten, F., and Lindsay S. W., *Safety of the Insect Repellent N, N-Diethyl-M-Toluamide (DEET) in Pregnancy*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 2001. **65** (4): p. 285-289.
29. Prevention, C.f.D.C.a. *Biomonitoring Summary, N,N-Diethyl-meta-toluamide (DEET)*. 2017 23.12.2016 [cited 2017 2.7.2017]; Available from: **https://www.cdc.gov/biomonitoring/DEET_BiomonitoringSummary.html**.
30. Antwi, F.B., L.M. Shama, and R.K.D. Peterson, *Risk assessments for the insect repellents DEET and picaridin*. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2008. **51**(1): p. 31-36.
31. Moore, S.J., Debboun, M., *History of Insect Repellents*. 2006.
32. Moore, S.J., A.J. Mordue Luntz, and J.G. Logan, *Insect bite prevention*. Infect Dis Clin North Am, 2012. **26**(3): p. 655-73.
33. Moore, S.J.a.L., A. D., *An Overview of Plants Used as Insect Repellents*. 2004.

34. Moore, S.J., and Lenglet, A.D., *An Overview of Plants Used as Insect Repellents*, in *Traditional Medicinal Plants and Malaria*. 2004, CRC Press LLC. p. 347.
35. Maia, M.F., Moore, S. J., *Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing*. Malar Journal, 2011. **10 Suppl 1**: p. S11.
36. Trongtokit, Y., Curtis, C. F. and Rongsriyam, Y., *Efficacy of repellent products against cages and free flying Anopheles stephensi mosquitoes*. South East Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, 2006. **36 (6)**.
37. Uzzan, B., et al., *Efficacy of four insect repellents against mosquito bites: a double-blind randomized placebo-controlled field study in Senegal*. Fundamental & Clinical Pharmacology, 2009. **23(5)**: p. 589-594.
38. Carroll, S.P. and J. Loye, *PMD, a registered botanical mosquito repellent with deet-like efficacy*. J.Am.Mosq.Control Assoc., 2006. **22(3)**: p. 507-514.
39. Trigg, J.K., *Evaluation of a eucalyptus-based repellent against Anopheles spp. in Tanzania*. J Am Mosq Control Assoc, 1996. **12(2 Pt 1)**: p. 243-6.
40. Naucke, T.J., et al., *Field evaluation of the efficacy of proprietary repellent formulations with IR3535((R)) and Picaridin against Aedes aegypti*. Parasitology Research, 2007. **101(1)**: p. 169-177.
41. Agency, U.S.E.P. *Regulation of Skin-Applied Repellents*. 2017 [cited 2017 2017-08-17]; Available from: <https://www.epa.gov/insect-repellents/regulation-skin-applied-repellents>.
42. Buescher, M.D., et al., *The Dose-Persistence Relationship of Deet against Aedes Aegypti*. Mosquito News, 1983. **43(3)**: p. 364-366.
43. Khan, A.A., H.I. Maibach, and D.L. Skidmore, *Insect Repellents - Effect of Mosquito and Repellent-Related Factors on Protection Time*. Journal of Economic Entomology, 1975. **68(1)**: p. 43-45.
44. Khan, A.A., H.I. Maibach, and D.L. Skidmore, *Addition of Perfume Fixatives to Mosquito Repellents to Increase Protection Time*. Mosquito News, 1975. **35(1)**: p. 23-26.
45. Schreck, C.E., *Techniques for the evaluation of insect repellents: a critical review*. Annu Rev Entomol, 1977. **22**: p. 101-19.
46. EPA, *Product Performance Test Guidelines*. 2010, United States Environmental Protection Agency.
47. EuropeanUnion, *Regulation (EU) No 528/2012 of the European Parliament and of the Council of 22 May 2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products*. Official Journal of the European Union, 2012.
48. R-Development-Core-Team, *R: A language and environment for statistical computing*. 2017, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

49. Wickham, H., *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. 2 ed. 2016: New York: Springer Nature.
50. Bissinger, B.W., Kennedy, M. K., Carroll, S. P., *Sustained efficacy of the novel topical repellent TT-4302 against mosquitoes and ticks*. Med Vet Entomol, 2016. **30**(1): p. 107-11.
51. Auysawasdi, N., et al., *Improving the effectiveness of three essential oils against Aedes aegypti (Linn.) and Anopheles dirus (Peyton and Harrison)*. Parasitol Res, 2016. **115**(1): p. 99-106.
52. Tisgratog, R., et al., *Evaluation of a Noncontact, Alternative Mosquito Repellent Assay System*. J Am Mosq Control Assoc, 2016. **32**(3): p. 177-184.
53. Logan, J.G., et al., *Arm-in-cage testing of natural human-derived mosquito repellents*. Malar.J., 2010. **9**: p. 239.
54. Tawatsin, A., Asavadachanukorn, P., Thavara, U., Wongsinkongman, P., Bansidhi, J. Boonruad, T., Chavalittumrong, P., Soonthornchareonnon, N., Komalamisra, N. and Mulla, M.S., *Repellency of Essential Oils Extracted from Plant in Thailand against four Mosquito Vectors (Diptera: Culicidae) and Oviposition Deterrent Effects against Aedes aegypti (Diptera: Culicidae)*. South East Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, 2005. **37** (5): p. 915-931.
55. Tawatsin, A., et al., *Repellency of volatile oils from plants against three mosquito vectors*. J.Vector.Ecol., 2001. **26**(1): p. 76-82.
56. Govere, J., et al., *Efficacy of three insect repellents against the malaria vector Anopheles arabiensis*. Medical and Veterinary Entomology, 2000. **14**(4): p. 441-444.
57. Tavassoli, M., et al., *Repellency Effects of Essential Oils of Myrtle (Myrtus communis), Marigold (Calendula officinalis) Compared with DEET against Anopheles stephensi on Human Volunteers*. Iranian Journal of Arthropod-Borne Diseases, 2011. **5**(2): p. 10-22.
58. Solomon, B., T. Gebre-Mariam, and K. Asres, *Mosquito Repellent Actions of the Essential Oils of Cymbopogon citratus, Cymbopogon nardus and Eucalyptus citriodora: Evaluation and Formulation Studies*. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 2012. **15**(5): p. 766-773.
59. Webb, C.E. and R.C. Russell, *Insect repellents and sunscreen: implications for personal protection strategies against mosquito-borne disease*. Australian and New Zealand Journal of Public Health, 2009. **33**(5): p. 485-490.
60. Walker, T.W., Robert, L. L., Copeland, R. A., Githeko, A. K., Wirtz, R. A., Githure, J. I. and Klein, T. A., *Field Evaluation of Arthropod Repellents, DEET and a Piperidine Compound, AI3-37220, against Anopheles funestus and Anopheles arabiensis in*

- Western Kenya*. Journal of the American Mosquito Control Association, 1996. **12** (2): p. 172-176.
61. Fradin, M.S. and J.F. Day, *Comparative efficacy of insect repellents against mosquito bites*. New England Journal of Medicine, 2002. **347**(1): p. 13-18.
 62. Yoon, J.K., et al., *Comparison of Repellency Effect of Mosquito Repellents for DEET, Citronella, and Fennel Oil*. J Parasitol Res, 2015. **2015**: p. 361021.
 63. Frances, S.P., et al., *Comparative Field Evaluation of Repellent Formulations Containing Deet and Ir3535 against Mosquitoes in Queensland, Australia*. Journal of the American Mosquito Control Association, 2009. **25**(4): p. 511-513.
 64. Schofield, S., Tepper, M., AND Gadawski, R., *Field Evaluation Against Mosquitoes of Regular and Polymer-Based Deet Formulations in Manitoba, Canada, with Comment on Methodological Issues*. Journal of Medical Entomology, 2007. **44** (3): p. 457-462.
 65. Tuetun, B., et al., *Repellent properties of celery, Apium graveolens L., compared with commercial repellents, against mosquitoes under laboratory and field conditions*. Trop.Med.Int.Health, 2005. **10**(11): p. 1190-1198.
 66. Frances, S.P., et al., *Laboratory and field evaluation of commercial repellent formulations against mosquitoes (Diptera : Culicidae) in Queensland, Australia*. Australian Journal of Entomology, 2005. **44**: p. 431-436.
 67. Frances, S.P., *Field Evaluation and User Acceptability of Repellent Formulations Containing Deet against Mosquitoes in Australia*. Journal of the American Mosquito Control Association, 2013. **29**(3): p. 289-292.
 68. Frances, S.P., et al., *Field evaluation of commercial repellent formulations against mosquitoes (Diptera : Culicidae) in northern territory, Australia*. Journal of the American Mosquito Control Association, 2005. **21**(4): p. 480-482.
 69. Frances, S.P., et al., *Field evaluation of repellent formulations containing deet and picaridin against mosquitoes in Northern Territory, Australia*. Journal of Medical Entomology, 2004. **41**(3): p. 414-417.
 70. PubMed. 2016, USNationalLibraryofMedicineNationalInstitutesofHealth
 71. Qualls, W.A., et al., *Field Evaluation of Commercial Repellents Against the Floodwater Mosquito Psorophora columbiae (Diptera: Culicidae) in St. Johns County, Florida*. Journal of Medical Entomology, 2011. **48**(6): p. 1247-1249.
 72. Khan, A.A., Maibach, H. I. and Skidmore, D. L., *Insect Repellents: Effect of Mosquito and Repellent-related Factors on Protection Time*. Journal of Economic Entomology, 1975. **68** (1).
 73. Khan, A.A., Maibach, H. I. and Skidmore, D. L., *Addition of perfume fixatives to mosquito repellents to increase protection time*. Mosquito News, 1975. **35** (1).

74. Cilek, J.E., J.L. Petersen, and C.F. Hallmon, *Comparative efficacy of IR3535 and DEET as repellents against adult Aedes aegypti and Culex quinquefasciatus*. Journal of the American Mosquito Control Association, 2004. **20**(3): p. 299-304.
75. Obermayr, U., A. Rose, and M. Geier, *A Novel Test Cage With an Air Ventilation System as an Alternative to Conventional Cages for the Efficacy Testing of Mosquito Repellents*. Journal of Medical Entomology, 2010. **47**(6): p. 1116-1122.
76. Champakaew, D., et al., *Assessment of Angelica sinensis (Oliv.) Diels as a repellent for personal protection against mosquitoes under laboratory and field conditions in northern Thailand*. Parasit Vectors, 2016. **9**(1): p. 373.
77. Trongtokit, Y., et al., *Laboratory and field trial of developing medicinal local Thai plant products against four species of mosquito vectors*. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2004. **35**(2): p. 325-33.
78. Usavadee Thavara, A.T., Jakkrawarn Chompoosri, Wannapa Suwonkerd,, U.-R.C. Asavadachanukorn, and PREECHA, *Laboratory and Field Evaluations of the Insect Repellent 3535 (Ethylbutylacetylaminopropionate) And DEET against Mosquito Vectors in Thailand*. 2001.
79. Moore, S.J., et al., *Field evaluation of traditionally used plant-based insect repellents and fumigants against the malaria vector Anopheles darlingi in Riberalta, Bolivian Amazon*. Journal of Medical Entomology, 2007. **44**(4): p. 624-630.
80. Deboun, M., et al., *Field evaluation of deet and a piperidine repellent against Aedes communis (Diptera : Culicidae) and Simulium venustum (Diptera : Simuliidae) in the Adirondack mountains of new York*. Journal of Medical Entomology, 2000. **37**(6): p. 919-923.
81. Barnard, D.R., et al., *Repellency of IR3535, KBR3023, para-menthane-3,8-diol, and deet to black salt marsh mosquitoes (Diptera : Culicidae) in the Everglades National Park*. Journal of Medical Entomology, 2002. **39**(6): p. 895-899.
82. Frances, S.P., et al., *Field evaluation of repellent formulations against daytime and nighttime biting mosquitoes in a tropical rainforest in northern Australia*. Journal of Medical Entomology, 2002. **39**(3): p. 541-544.
83. Barnard, D.R., et al., *Mosquito density, biting rate and cage size effects on repellent tests*. Medical and Veterinary Entomology, 1998. **12**(1): p. 39-45.

Supplementary data

Table 1: Fifteen laboratory experiments

Active ingredient	Method and cage size	Amount of repellent	No. Mosquitoes, (age)	Mosquito species	N	Protection	Results	Source
Commercial products: DEET 25% Plant based products and products with vanillin	Arm in cage test (28'000 cm ³)	100 mikroliters per 3×10 cm per forearm	N=250 (5-7)	<i>Ae. aegypti</i> <i>An. dirus</i>	5	%R ¹	Products with vanillin (as fixative) show better protection than products without.	Auysawasdi <i>et al.</i> (2016)
Commercial products: DEET 25% TT-4302t: 5% geraniol	Arm in cage test (cage size not mentioned)	1 ml per 600cm ²	N=200	<i>Stegomyia aegypti</i> (= <i>Ae. aegypti</i>)	3 women, 3 men	%R ²	15% DEET provided 4.7 h repellency, TT-4302 provided an average of 6.5 h of repellency of ≥95%	Bissinger <i>et al.</i> (2016)
Non-commercial product: DEET 12%	Chamber system	1 ml per 30 cm ²	N= 10 (4-5)	<i>Ae. aegypti</i>	4 women, 4 men	CPT ⁶	No significant differences in protection times between the 8 volunteers, no significant difference between females and males.	Trisgatrog, <i>et al.</i> (2016)
Commercial products: Citronella 5% DEET 24% Fennel Oil 5%	Arm in cage test (80'000 cm ³)	1.5 ml per forearm	N=200 (5-10)	<i>Ae. albopictus</i> <i>Cx. pipiens</i> <i>Ae. togoi</i>	10-20	%R ¹ and CPT ¹	CPT: DEET = 360 min. CPT: Citronella = 9.5min CPT: Fennel Oil	Yoon <i>et al.</i> (2015)
Non-commercial products: DEET 10% Div. semiochemicals	Arm in cage test (125'000 cm ³)	0.5 ml per forearm	N=50	<i>An. gambiae</i> s.s. <i>Cx. quinquefasciatus</i> <i>Ae. aegypti</i>	6	%R ¹	<i>An. gambiae</i> s.s.: DEET 10% showed a %R of 100% till hour 6 and 94% till hour 8 <i>Cx. quinquefasciatus</i> : DEET 10% showed a %R of 100% till hour 6 and 93% till hour 8; <i>Ae. aegypti</i> : DEET 10% showed a %R till 100% till hour 6 and >96% till hour 8	Logan <i>et al.</i> (2010)
Commercial products: DEET 7%, 17%, 80% With and without sunscreen	Arm in cage test (36'000 cm ³)	1g per forearm	N=50 (3-7)	<i>Ae. aegypti</i>	not mentioned	CPT ²	DEET 7% (with and without sunscreen): 230±18.4 Min. and 240±15.5 Min. (mean ± standard error) DEET 17% (with and without sunscreen): 330±25.2 Min. and 400±12.7 Min. (mean ± standard error) DEET 80% (with and without sunscreen): 770±54.8 Min. and 830±20.2 Min (mean ± standard error)	Webb, C. E. <i>et al.</i> (2009)

Commercial products: PMD 30% 2xPMD 20% PMD 10% Citronella oil 40%, Citronella oil 5% DEET 50% Clove oil 10%	Arm in cage test (27,000 cm ²) and room test	1 g per 600cm ² forearm and lower leg	N=30 (3-8)	<i>An. stephensi</i> (BEECH)	not mentioned	CPT and %R ⁶	PMD 20% protected for 7-8 hours in the arm in cage tests and PMD 10% protected for 30 minutes only. PMD 20% and 30% protected for 11-12 hours in the room test with free flying mosquitoes. 50% DEET > 20-30% PMD > 40% citronella = 10% clove plus 10% > 5% citronella.	Trongtoit, Y. et al. (2006)
Non-commercial products: DEET 10% IR3535 10% others (plant oils)	Arm in cage test (27,000 cm ²)	0.1 ml on 3x10 cm per forearm	N=250 (4-5)	<i>Ae. aegypti</i> , <i>Ae. albopictus</i> , <i>An. dirus</i> and <i>Cx. quinquefasciatus</i>	6	CPT ⁵	DEET and IR3535 protected well against all four mosquito species (6.7- 8 hours). All essential oils protected 4.5-8h against <i>Ae. albopictus</i> , <i>An. dirus</i> and <i>Cx. quinquefasciatus</i> but only 0.3-2.8 h against <i>Ae. aegypti</i> .	Tawatsin et al. (2005)
Non-commercial products: DEET and EBAAP 10%, 20% as cream and as sprays Commercial products with EBAAP 7.5% (3 different products with and without sunscreen), 20%	Arm in cage test (21'458 cm ³)	1g per 500 cm ²	N=50 (6-10)	<i>Ae. aegypti</i> <i>Cx. quinquefasciatus</i>	5 Women 3 Men	CPT ³	Protection of DEET and EBAAP was similar, whereas formulations with 20% protected better (<i>Ae. aegypti</i> : 3 hrs. and <i>Cx. quinquefasciatus</i> : 6 hrs.)	Cilek, J. E. et al. (2004)
Commercial products: DEET 4.75%, 6.65%, 20%, 23.8% EBAAP 7.5% Several plant based repellents Wristband Lotion	Arm in cage test (14'520 cm ³)	Amount not mentioned	N=10 (7-24)	<i>Ae. aegypti</i>	10 Women 5 Men	CPT ³	Formulations with DEET showed a longer protection time than products with EBAAP. There is a correlation with the concentration of DEET and the protection time. EBAAP 7.5%: 22.9 Min. DEET 4.75%: 88.4 Min. DEET 6.65%: 112.4 Min. DEET 20.0%: 234.4 Min. DEET 23.8%: 301.5 Min. Wristband with DEET showed no protection at all.	Fradin, M. S. et al. (2002)
Non-commercial product: Icaridin 20%	BG cage (27'000 cm ³) Standard cage (91'125 cm ³)	1g per 600 cm ²	N=30 N=200	<i>Ae. aegypti</i> , Field: <i>Ae. vexans</i> , <i>Oc. sticticus</i>	3 Women 1 Man Field: N=10	CPT ⁴	Same formulation protects better in the BG cage than in the conventional cage. CPT = 6.3±0.6 hrs (BG cage) and 1.6±0.2 hrs (conventional cage). Protection %R>95% = 7.8±0.1 hr (BG cage) and 5.0±0.2 hrs (conventional cage) Field: CPT = 7.3±0.5 hrs and %R>95% 7.8±0.2 hrs	Obermayr, U. et al. (2010)

Non-commercial products: DEET 25% (with and without Vanillin) Several plant extracts	Arm in cage test (64'000 cm ³) Large room (108 m ³): lower leg	0.1 ml/3x10cm per forearm, ca. 3 ml per lower leg	N=250 (3-5) N=250 (3-5)	<i>Ae. aegypti</i> <i>An. dirus</i> <i>Cx. quinquefasciatus</i>	3	CPT ⁵ (Arm in cage test) and %R ⁶ (Large room)	Protection time of DEET was 100% at hour 6 with <i>Ae. aegypti</i> and <i>Cx. quinquefasciatus</i> and 58.3% with <i>An. dirus</i> . Plant extracts with Vanillin could replace DEET.	Tawatsin <i>et al.</i> (2001)
Commercial products: DEET 15%, towelletes with 0.5g of PMD, products with plant extracts	Arm in cage test (64'000 cm ³)	0.5g, 0.8g, 1.2g per product	N=200(4-6)	<i>An. arabiensis</i>	3 Men	%R ⁷	All 3 repellents protected for 4-5 hrs.	Govere <i>et al.</i> (2000)
Non-commercial products: DEET 25% Plant extracts : 50%	Arm in cage test (125'000 cm ³)	1 ml in ethanol	N=150-170 (7-10)	<i>An. stephensi</i>	4 Men	CPT ⁵	The mean complete protection time of DEET 25% was 6.23 hrs and much higher than the protection time of the plant extracts with 4.3 or 2.1 hrs.	Tavassoli, M. <i>et al.</i> (2011)
Non-commercial products: DEET 15% Plant based extracts: 10%, 20%	Arm in cage test (cage size not mentioned)	1.0 g of product per 600 cm ²	N=50 (3-5)	<i>An. arabiensis</i>	4	%R ⁶	DEET protected for 4 hrs (%R > 95%) and was better than the plant based repellents.	Solomon, B. <i>et al.</i> (2012)

Table 2: Field trials

Active ingredient	Method	Amount of Repellent	N	Mosquito species	Protection time	Results	Source
Commercial products: DEET 35%, 40%	HLC: lower leg	DEET 35%: 0.48±0.1 mg/cm ² DEET 40%: 0.77±0.1 mg/cm ²	1 women 2 men	40.4% <i>Cx. annulirostris</i> 36.8% <i>Ae. vigilax</i> 12.5% <i>Ma. uniformis</i>	%R ¹	DEET 35% protects for 3 hrs. (%R > 95%) DEET 40% protects for 6 hrs. (%R > 95%)	Frances, S.P. (2013)
Commercial products: DEET 15% and other plant based products	HLC on both forearms (different products per arm)	1 ml per 550 cm ²	2 women 5 men	1. Collection: 94% <i>Psorophora columbiae</i> 2. Collection: 89% <i>Ps. columbiae</i>	CPT ¹	DEET 15% protects for 130 Min. Plant based products protected better than DEET 15%	Qualls, W.A. <i>et al.</i> (2011)
Commercial products: Icaridin 20% PMD 20%, 50% DEET 50%	HLC : lower leg (only bites were counted)	15 ml per lower leg	33 women 67 men	32% <i>Anopheles spp.</i> , whereof 11% <i>An. gambiae</i> 31% <i>Culex</i> species 27.5% <i>Mansonia spp.</i> 0.2% <i>Aedes spp.</i>	%R ²	All repellents showed a similar protection: 50% of the participants were protected for 5 hrs, 50% were protected for 90%. Statistically not significant (p = 0.07) but DEET 5% protected better than PMD 20%.	Uzzan, B. <i>et al.</i> (2009)
Commercial product: EBAAP 7.5% Non-commercial product: DEET 34.6%	HLC: lower leg	Test 1: EBAAP 7.5%: 1.46±0.31 mg/cm ² DEET 34.6%: 2.15±0.67 mg/cm ² Test 2: EBAAP 7.5%: 0.94±0.22mg/cm ² DEET 34.6%: 0.54±0.07 mg/cm ²	3 women 3 men (3 per test)	Test 1: 58.9% <i>Ma. uniformis</i> 33.4% <i>Cx. annulirostris</i> Test 2: 85.7% <i>Ae. vigilax</i>	%R ¹	EBAAP 7.5% protects for 1 hr. at least 95% against <i>Ma. uniformis</i> and <i>Cx. annulirostris</i> and shows at least 85% protection against <i>Ae. vigilax</i> . DEET 35% protected for 5 hrs against all three species.	Frances, S.P. <i>et al.</i> (2009)
Commercial products: DEET 30%, 31.58%, 33.33%	HLC: lower leg and forearm	1.5g per 600 cm ²	2 women 2 men	92% <i>Oc. sticticus</i> 5.2% <i>Ae. vexans</i>	CPT ²	All products showed a similar protection of 623±107 to 644±163 Min.	Schofield, S. <i>et al.</i> (2007)

Non-commercial products: Sprays with EBAAP 10%, 15%, 20% Spray with Icaridin 20% Lotion with EBAAP 10%, 15% Lotion with Icaridin 10%	HLC with both arms, stretched out (1 arm with repellent and 1 arm as control)	1.5 g Lotion odor 1 g spray pro 600 cm ²	5 women 5 men	100% <i>Ae. aegypti</i>	%R ³ and CPT ²	All products protected 95% till hour 6, exception: EBAAP (10%) lotion with 95% till hour 4.	Naucke, T.J. <i>et al.</i> (2007)
Non-commercial products: Study A: DEET 15% Combination of PMD 15% or 20% and Lemongrass Study B: Combination of PMD 16% and Lemongrass DEET 20%	HLC: lower leg	0.002 ml/cm ²	Study A: 5 Study B: 3	Study A: 55.6% <i>Psorophora varipes</i> 24.8% <i>Ae. ochlerotatus taeniorhynchus</i> Study B: 86% <i>An. darlingi</i>	%R ¹	Combination of PMD and Lemongrass protected up to 6hrs. Study A: DEET protected > 92% for 5 Std. PMD/LG protected >98% for 5 Std. Study B: DEET protected 62% for 6 Std. PMD/LG protected 95% for 6 Std.	Moore, S.J. <i>et al.</i> (2007)
Commercial products: Icaridin 9.3% DEET 80% Mixtures of DEET 10% and other substances	HLC: lower leg	Icaridin 9.3%: 1.48±0.26 mg/cm ² DEET 80%: 1.14±0.28 mg/cm ² DEET 10% Mix: 1.41±0.36 mg/cm ²	4 men	63.2% <i>Cx. annulirostris</i> 19.6% <i>Oc. normanensis</i> 8.6% <i>An. meraukensis</i>	%R ¹	DEET 10% and 80% protected longer than Icaridin 9.3%: • Icaridin 9.3% protected for 2 hrs. (%R > 95%) • DEET 10% protected for 7 hrs. (%R > 95%) • DEET 80% protected for more than 8 hrs. (%R > 95%)	Frances, S.P. <i>et al.</i> (2005)
Commercial products: Icaridin 19.2% Non-commercial products: DEET 20%, 35%	HLC: lower leg	Icaridin 9.3%: 1.74±0.33 mg/cm ² DEET 20%: 1.33±0.14 mg/cm ² DEET 35%: 1.20±0.15 mg/cm ²	4 men	57.8% <i>Cx. annulirostris</i> 15.4% <i>An. meraukensis</i> 13.2% <i>An. bancroftii</i>	%R ¹	Low protection against <i>Anopheles</i> spp: • Icaridin 19.2% and DEET 35% protected for 1 hrs. (%R > 95%) • DEET 20% protected less than 1 hr. (%R > 95%) Good protection against <i>Cx. annulirostris</i> : • Icaridin 19.2% protect for 5 hrs. (%R > 95%) • DEET 20% and 35% protect for 7 hrs. (%R > 95%)	Frances, S.P. <i>et al.</i> (2004)

Commercial products: Icaridin 9.3%, 19.2% DEET 20%, 33% Non-commercial product: DEET 35%	HLC: lower leg	0.91-1.67 mg/cm ²	4 men	73.8% <i>Verrallina lineata</i> 6.9% <i>Oc. kochi</i> 6.7% <i>An. farauti</i> s.s. 6.1% <i>Oc. notoscriptus</i>	%R ¹	Icaridin 9.3% protected for 2 hrs. (%R > 95%) Icaridin 19.2% protected for 9 hrs. (%R > 94.7%) DEET 20% protected for (only during the day) 6 hrs. (%R > 95%) DEET 33% protected (only during the day) at least for 8 Std. (%R > 95%) DEET 35% protected for 7 hrs. (%R > 95%)	Frances, S.P. <i>et al.</i> (2002)
Non-commercial products: DEET 25% EBAAP 25% Icaridin 25% PMD 40%	HLC: forearm	1 ml per 650 cm ²	5 men	<i>Oc. taeniorhynchus</i>	%R ¹ and CPT ⁻³	Mean CPT for EBAAP 25% is 3 hrs, for Icaridin 25% 5.4 hrs, for PMD 40% 3.8 hrs and for DEET 25% 5.6 hrs. All products showed a %R of at least 60% after 7 hrs.	Barnard D.R. <i>et al.</i> (2002)
Non-commercial products: Active ingredients (undiluted) DEET AI3-37220 DEET + AI3-37220 (1:1)	HLC: forearm, worked in pairs	0.25 mg/cm ²	2 women 4 men	<i>Ae. communis</i>	%R ¹	All 3 active ingredients protected for 4 hrs at least for 95%. After 6 hrs %R of DEET was below 90% and AI3-37220 was more than 95%. The combination of the two active ingredients did not protect better than one of them alone.	Debboun, M. <i>et al.</i> (2000)
Non-commercial products: DEET 5% AI3-37220 5%	HLC: lower leg	0.1 mg/cm ²	12 men	<i>An. arabiensis</i> 72% (<i>An. funestus</i> and <i>An. gambiae</i> s.l.) and <i>Culex</i> sp.	%R ³	Deet >80% protection for 3 h, AI3-37220 provided 89.8% and 71.1% protection against <i>An. arabiensis</i> and <i>An. funestus</i> after 9h.	Walker <i>et al.</i> (1996)

Table 3: Studies with laboratory (white background) and field (green background) data

Active ingredient	Cage size (cm ³)	No. Mosquitoes (age)	Amount of repellent	Mosquito species	N	Protection Time	Active ingredient	Amount of repellent	Mosquito species	N	Protection Time	Laboratory vs. Field	Source
Non-commercial products: DEET 5, 10, 15, 20, 25% with and without vanillin and <i>Angelica sinensis</i> (Oliv.) hexane extract (AHE)	27000	N=250 (5-7)	0.1 ml per 3x10 cm forearm area	<i>Ae. aegypti</i>	1 women, 1 man	CPT ²	DEET 5, 10, 15, 20, 25% with and without vanillin and <i>Angelica sinensis</i> (Oliv.) hexane extract (AHE)	2ml per lower leg	54.3% <i>Culex</i> 43.3% <i>Armigeres</i> 24% <i>Aedes</i> 4% <i>Anopheles</i> 4% <i>Mansonia</i>	6	%R ⁵	AHE protection against <i>Ae. aegypti</i> is comparable to DEET in laboratory and field experiments.	Champakaew, D. et al. (2016)
Commercial products: DEET 20% SS220 20%	not mentioned	N=100 (6-9 days)	1ml per forearm	<i>Ae. aegypti</i> <i>An. farauti</i> <i>Cx. annulirostris</i>	1	CPT ⁴	DEET 20% SS220 20%	1ml per lower leg	84.5% <i>Cx. annulirostris</i>	2 men, 1 women	%R ⁵	DEET protected better than SS220 in the lab study and in the field SS220 protected better than DEET	Frances, S.P. et al. (2009)
Commercial products: DEET 30%, 33.25%	not mentioned	N=750 (6-12 days)	1.5g per 600 cm ² per forearm	<i>Ae. aegypti</i>	2	CPT ²	Commercial products: DEET 30%, 33.25%	lower leg, dose not mentioned	86% <i>Oc. sticticus</i> 13% <i>Ae. vexans</i>	2 women, 3 men	CPT ²	CPT is reduced after sports: from 468 to 267 Min. in the lab and from 359 to 203 Min. in the field.	Schofield, S. et al. (2007)
Commercial products: PMD 10%, 20% DEET 10%, 30%	91'125	N=200 (3-4 days)	1g/600 cm ²	<i>Ae. aegypti</i>	1-9	CPT ³	Commercial products: PMD 20% (as in the lab) and PMD 26% and DEET 20%	1 and 1.5g/600 cm ²	64% <i>Oc. melaninon</i> 32% <i>Ae. vexans</i> 3% <i>Oc. incertus</i>	2-20	CPT ³	PMD and DEET show similar protection times in the lab and in the field	Carroll, S.P. et al. (2006)
Commercial and not available products: DEET 3.0%, 6.9%, 12.6%, 31.6%, 34.6%, 80% EBAAP 7.5% Icaridin 9.3%, 19.1% other products	27000	N=250 (6-9 days)	mean application rate of 2.66 mg cm ²	<i>An. farauti</i> <i>Cx. annulirostris</i> <i>Ae. aegypti</i> <i>Oc. vigilax</i>	1-3	CPT ⁴	Commercial and not available products: DEET 6.9%, 12.6%, 80% Icaridin 9.3%, 19.1%	areas lower leg range: (range 1798-2450 cm ²)	Test 1: 49.9% <i>Cx. annulirostris</i> 21.2% <i>Verrallina sp.</i> 15.9% <i>Oc. vigilax</i> Test 2: 58.8% <i>Cx. annulirostris</i> 22.1% <i>Oc. vigilax</i>	4	%R ⁵	Formulations with DEET in higher concentrations showed the best protection whereas products with Icaridin showed less protection. EBAAP was tested in the lab only and showed a short protection time.	Frances, S.P., et al. (2005)
Commercial products: DEET 14.3%, EBAAP 10%, 12%, 20% Ethanollic solutions: DEET 10%, 15%, 20%, 25% Other products	27000	N=250 (5-7 days)	0.1 ml/cm ² per 3x10 cm forearm area	<i>Ae. aegypti</i>	2 women, 2 men	CPT ²	Formulation mixtures were tested and a comparison with the laboratory experiment was not possible.	lower leg, dose not mentioned	32.7% <i>An. barbirostris</i> 28.5% <i>An. subabatus</i> 12.8% <i>Ma. uniformis</i> 10.4% <i>An. garcherli</i>	2 x (2 women, 2 men)	%R ⁵	A comparison between lab and field was not possible because there were not the same products tested. In the laboratory showed DEET a better protection than EBAAP.	Tuetun, B. et al. (2005)

Non-commercial products: 5 plant extracts as gel or cream	not mentioned	N=250 (4-5 days)	3x10 cm per forearm, 0.1 g/cm ²	<i>Cx. quinquefasciatus</i> <i>Ae. aegypti</i> <i>An. dirus</i>	6	CPT ²	Best 2 products from laboratory studies were tested in the field experiment.	1g per lower leg	Rachathewi, Bangkok: 99.6% <i>Cx. quinquefasciatus</i> Toong Kru, Bangkok: 100% <i>Ae. aegypti</i> Bang Bo, Samut Prakan: 86.1% <i>Ma. uniformis</i> Sai Noi, Nonthaburi: 42.5% <i>Cx. siliens</i> 27.4% <i>Cx. gelidus</i> 23.5% <i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	2 women, 2 men	%R ⁵	Plant gels protectrd better (95.7%) than gels with DEET (82.7%) at hour 5.	Trongtokit, Y. et al. (2004)
Non-commercial products: DEET 20%EBAAP 20%	27000	N=250 (3-5 days)	0.1 ml per 30cm ² forearm	<i>Ae. aegypti</i> <i>Cx. quinquefasciatus</i> <i>Cx. tritaeniorhynchus</i> <i>An. dirus</i>	3	CPT ²	DEET 20% EBAAP 20%	3 ml per lower leg	<i>Ae. albopictus</i> <i>Ar. subalbatus</i> <i>Cx. siliens</i> <i>Ma. dives</i> <i>Cx. gelidus</i> <i>An. hyrcanus</i> Species composition depends on locations and season	6	CPT	DEET and EBAAP show similar protection in the field and in the laboratory.	Thavara, U. et al. (2001)

Chapter 3

Mosquito diversity of the Nature Reserve Langholz, Canton of Aargau



Nature Reserve Langholz, Canton of Aargau 2014

Summary of the study report: “Vorkommen von Stechmücken im Naturwaldreservat Langholz, Kanton Aargau“

Mosquito diversity of the Nature Reserve Langholz, Canton of Aargau

The Nature Reserve Langholz is a forest area located in the Canton of Aargau, Switzerland and is frequently visited by walkers, bikers, joggers and other visitors. The forest was restored by flooding the area through three newly built dams. Many new ponds and tarns were created and the aim of the current study was to investigate their influence on the mosquito diversity and abundance in the area. This survey was part of our pilot study to find suitable locations in Switzerland for the extensive field trials planned for 2015.

Every second week from July 14th till October 7th 2014 we screened selected ponds for mosquito larvae and set traps to collect gravid females with the BG-Sentinel trap or used ovitraps to search for invasive *Aedes* species.

A total of 1,849 mosquitoes were collected and 17 different species identified. The most common species were *Anopheles maculipennis* s.l., *Culex martinii*, *Cx. pipiens/torrentium*, *An. claviger* and *An. territans*. In addition to the indigenous species we also identified the invasive mosquito species *Aedes japonicus*.

Some of the identified species are potential vectors of various viruses or malaria. In order to become infected by such a pathogen through a mosquito bite in Switzerland a competent mosquito would first need to take an infectious blood meal and the ambient temperature would need to be ideal for the parasite to develop inside that mosquito. The likelihood that all factors are given in the local context is almost zero. As the Langholz has been renaturalised only recently predictions as to how mosquito diversity may change in the future are very difficult to make. We, therefore, recommend a long term monitoring study in a reduced form including reference surfaces without flooded areas. Additionally, it would be helpful to investigate if mosquitoes are a nuisance for the visitors of the Langholz Nature Reserve.

*Im Auftrag des Kantons Aargau, Departement Bau, Verkehr und Umwelt,
Abteilung Wald*

Vorkommen von Stechmücken im Naturwaldreservat Langholz, Kanton Aargau

27. März 2015

Impressum

Auftraggeber

Kanton Aargau, Departement Bau, Verkehr und Umwelt, Abteilung Wald

Auftragnehmer

Schweizerisches Tropen- und Public Health-Institut, Socinstrasse 57, Postfach, 4002 Basel

Autoren

Barbara Colucci

Tobias Suter

Laura Vavassori

Dr. Pie Müller

Hinweis

Diese Studie wurde im Auftrag des Kantons Aargau, Departement Bau, Verkehr und Umwelt, Abteilung Wald, durchgeführt. Für den Inhalt ist allein der Auftragnehmer verantwortlich.

Abkürzungen

BG	Biogents
L	Larven
MALDI-TOF MS	Matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry
OT	Ovitrap; Eiablagefalle
Swiss TPH	Swiss Tropical and Public Health Institute (Deutsch: Schweizerisches Tropen- und Public Health-Institut)
WGS	World Geodetic System

Inhaltsverzeichnis

Auftraggeber	2
Auftragnehmer	2
Autoren	2
Hinweis	2
Zusammenfassung	5
1 Einleitung	6
2 Material und Methoden	7
2.1 Studiengebiet und Zeitrahmen	7
2.2 Sampling Protokoll	7
2.3 Sammeln der Mückenlarven	9
2.3.1 Ausgewählte Wasserstellen für das Sammeln der Stechmückenlarven	10
2.4 Eiablagefallen (Ovitrap) für invasive <i>Aedes</i> Arten	11
2.4.1 Fallenstandorte für Eiablagefallen (Ovitrap)	12
2.5 Bestimmen ausgewachsener Stechmücken	13
2.5.1 Fallenstandorte der BG Sentinel Fallen	13
3 Bestimmung der Stechmücken	15
3.1 Aufzucht von kleinen Larven	15
3.2 Bestimmung der Stechmückenarten	15
3.2.1 Morphologische Bestimmung	15
3.2.2 Bestimmung der Art mit MALDI-TOF MS	16
4 Resultate und Diskussion	16
4.1 Räumliche und zeitliche Verteilung der Stechmückenarten	17
4.2 Relevanz der einzelnen Stechmückenarten für die Besucher des Langholzes	21
5 Schlussfolgerungen	24
6 Empfehlungen	24
7 Danksagung	24
8 Literaturverzeichnis	25

Zusammenfassung

Im Naturwaldreservat Langholz wurden in drei Bauetappen neue Dämme gebaut um viele Bereiche wieder unter Wasser zu setzen. Welchen Einfluss diese neuen Teiche und Tümpel auf die Stechmückenpopulationen im Gebiet haben, wurde 2014 im Rahmen einer ersten Studie untersucht. Dazu wurden vom 14. Juli bis 7. Oktober 2014 alle zwei Wochen ausgewählte Teiche nach Mückenlarven abgesucht. Zusätzlich wurden Mückenfallen aufgestellt, die blutsuchende Stechmückenweibchen anlocken sollen, sowie Eiablagefallen, um das Vorhandensein von invasiven *Aedes* Arten abzuklären. In der Untersuchungsperiode wurden insgesamt 1'849 Stechmücken von 17 verschiedenen Arten gesammelt und ausgewertet. Häufige Arten waren *An. maculipennis* s.l., *Cx. martinii*, *Cx. pipiens/torrentium*, *An. claviger* und *An. territans*. Neben den einheimischen Arten wurde auch die invasive, asiatische Buschmücke (*Ae. japonicus*) nachgewiesen. Einige dieser Arten könnten verschiedene Viren oder Malaria auf den Menschen übertragen. Diese Mücke müsste sich durch ein vorgängiges Blutmahl infiziert haben und das Klima müsste die Entwicklung des Parasiten in der Mücke erlauben. Die Wahrscheinlichkeit, dass all diese Faktoren gegeben sind, ist sehr gering. Da die Wiedervernässung erst seit kurzem besteht, ist noch unklar, ob und wie sich die Situation in naher Zukunft verändern wird. Deshalb wird ein reduziertes Langzeitmonitoring für das Gebiet, mit Einbezug von Vergleichsflächen ohne Wiedervernässung, empfohlen. Zudem wäre im Sinne einer Interessensabwägung zwischen Naturschutz und Freizeitnutzung eine Erhebung der effektiven Belästigung durch Mückenstiche im und um die Wiedervernässungszone nützlich.

1 Einleitung

In der Vergangenheit wurde der Wald im Gebiet des Naturwaldreservats Langholz (Abbildung 1), Kanton Aargau, durch ein dichtes Grabensystem entwässert. Damit das Gebiet für die standorttypischen wechselfeuchten bis nassen Waldgesellschaften und die darauf angewiesenen seltenen Tier- und Pflanzenarten wieder zurückgewonnen werden kann, wurden in den vergangenen Jahren in drei Bauetappen die alten Gräben wieder verschlossen und neue Dämme erstellt.

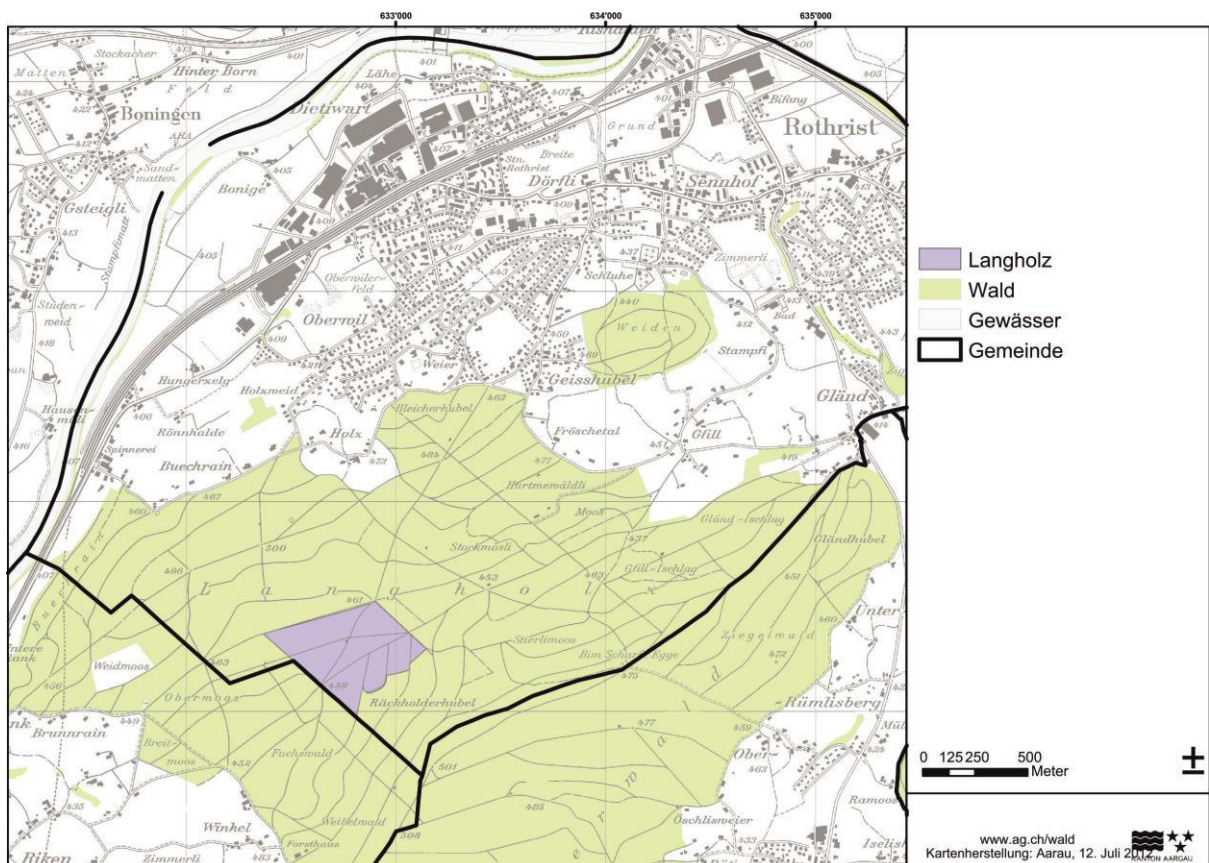


Abbildung 1: Naturwaldreservat Langholz mit Wiedervernässungsgebiet in der Gemeinde Rothrist, Kanton Aargau. Violett eingefärbte Fläche: Wiedervernässungsgebiet. Quelle: https://www.ag.ch/de/bvu/wald/naturschutz_im_wald/waldreservate_im_aargau/kulm_zofingen/langholz/langholz_1.jsp

Bisher ist nicht bekannt, welchen Einfluss die Wiedervernässung im Langholz auf das Vorkommen von Stechmücken hat, bzw. haben wird. Die Wiedervernässung könnte zu höheren Mückendichten führen und auch neuen, invasiven Arten, wie der asiatischen Buschmücke, *Aedes japonicus*, ideale Brutstätten bieten. Eine hohe Dichte an Stechmücken könnte zu einer ernstzunehmenden Belästigung für die Besucher des Langholzes führen. Im Extremfall wäre sogar ein erhöhtes Risiko von durch Mücken übertragenen Krankheiten, wie z.B. das von Vögeln auf Menschen übertragene West-Nil-Fieber, möglich. Zudem liegen die nächstgelegenen Wohngebiete nur rund einen Kilometer vom Waldnaturreservat entfernt (Abbildung 1).

Der Lebenszyklus der Stechmücke durchläuft vier Stadien: Ei, Larve, Puppe und Imago (ausgewachsene oder adulte Stechmücke). Die Entwicklung vom Ei bis zur Puppe findet im Wasser statt und ist temperaturabhängig. Stechmücken kommen in warmen und feuchten Sommermonaten gehäuft vor.

In der vorliegenden Studie wurden während den Sommermonaten (Juli bis Oktober 2014) die Artenzusammensetzung, sowie die zeitliche und lokale Verbreitung der Stechmücken im Wiedervernässungsgebiet Langholz dokumentiert. Folgende Fragen standen bei der Untersuchung im Vordergrund:

1. Welche Stechmückenarten kommen im Langholz vor?
2. Gibt es invasive Stechmückenarten wie die asiatische Buschmücke?
3. Wie ist die saisonale und räumliche Verbreitung der Stechmücken?
4. Welche Probleme mit Stechmücken könnte es geben in Bezug auf die Erholungsnutzung des Langholzes (z.B. Spazieren, Biken oder Vita Parcours)?
5. Ist eine dauernde Überwachung der Wiedervernässungszone im Langholz, oder in anderen Gebieten, notwendig?

Das Projekt soll wichtige Daten über das lokale Vorkommen und die Artenzusammensetzung der Stechmücken im Naturwaldreservat Langholz liefern. Die Ergebnisse bilden die Grundlage für eine Einschätzung der möglichen Probleme im Zusammenhang mit der Nutzung des Langholzes als Freizeit- und Erholungsgebiet. Weiter sollen sie eine erste Einschätzung des Risikopotentials für Mensch und Tier (Übertragung von Infektionskrankheiten) wie auch für die Umwelt (invasive Mückenarten) ermöglichen. Darüber hinaus werden die Ergebnisse aus dem Langholz aufzeigen, ob und wie weit Renaturierungsprojekte allgemein ein Problem in Bezug auf die Verbreitung von Stechmücken darstellen.

2 Material und Methoden

2.1 Studiengebiet und Zeitrahmen

Die Erhebungen wurden im Naturwaldreservat Langholz in der Gemeinde Rothrist, Kanton Aargau, vom 14.Juli 2014 bis 7.Oktober 2014 durchgeführt (Abbildung 1 und 2).

2.2 Sampling Protokoll

Da der zeitliche und personelle Aufwand zu gross wäre, um sämtliche Wasserstellen im Studiengebiet nach Mückenlarven abzusuchen, wurde eine möglichst repräsentative Auswahl getroffen. Dazu wurden die Wasserstellen nach einem Zufallsprinzip vor Studienbeginn ausgewählt. Diese Stellen wurden dann alle zwei Wochen aufgesucht und auf das Vorhandensein von Stechmückenlarven geprüft und anschliessend ausgewertet. Der maximale Zeitaufwand für die Erhebungen im Feld sollte zwei Arbeitstage nicht überschreiten.

Für die Auswahl der Wasserstellen wurde ein virtuelles Raster von 25 m x 25 m über das Studiengebiet gelegt. Die Rasterquadrate wurden nach Bauetappen der Wiederverwässerung (Bauetappe 1+2 und Bauetappe 3) stratifiziert und durchnummeriert. Danach wurde mit

einem Zufallsgenerator [2] eine Sequenz erstellt, wonach die einzelnen Raster im Feld abgesucht und untersucht wurden. Im zufällig ausgewählten Rasterquadrat wurden dann alle Wasserstellen nach Mückenlarven abgesehen. Alle zu Beginn gewählten Standorte wurden während der gesamten Studie beibehalten (Abbildung 2).

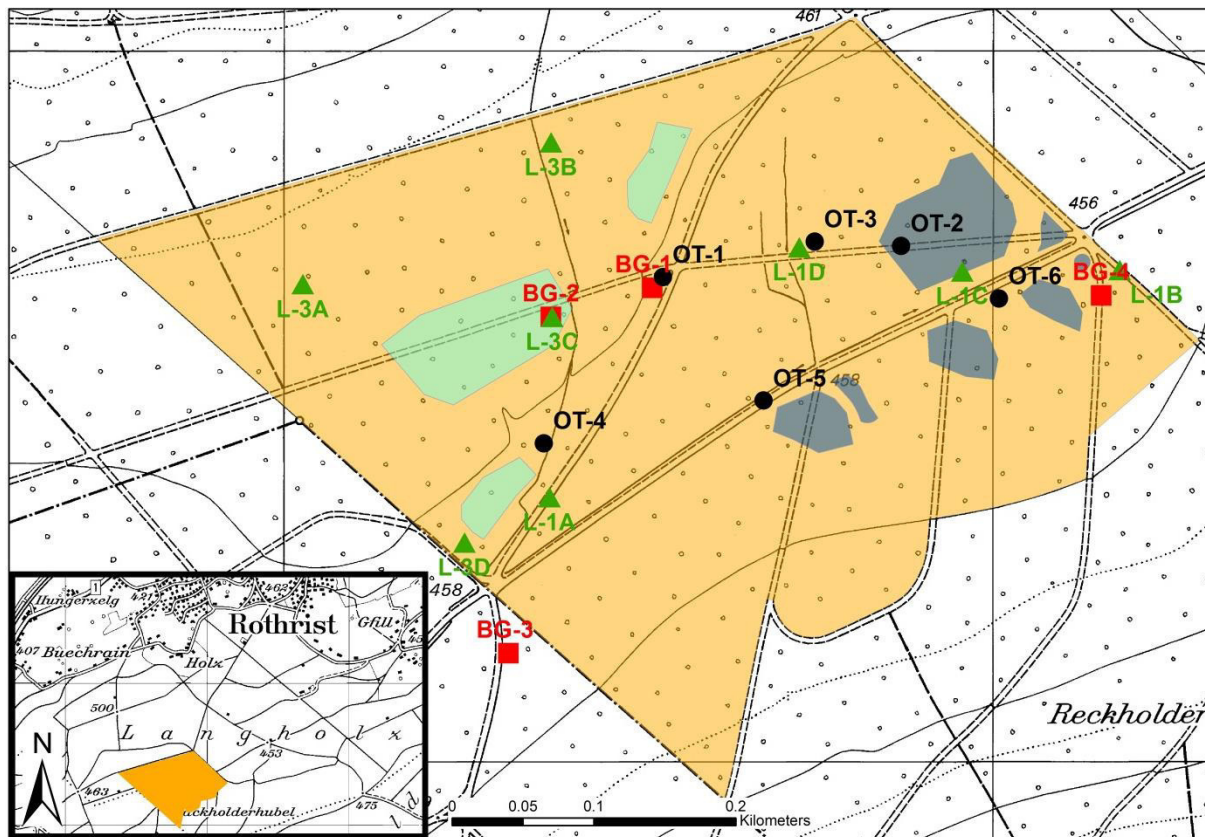


Abbildung 2: Studienggebiet. Die Erhebungen wurden innerhalb des Perimeters (orange) durchgeführt. Hellgrüne Flächen: Gewässer, die während der ersten und zweiten Bauetappe entstanden waren. Graue Flächen: Gewässer, die während der dritten Bauetappe gebildet wurden. L: Sammelstellen der Larven, BG: Standorte der BG Sentinel Fallen, OT: Standorte der Ovitrap (Eiablagefallen).

Zu den Larvensammlungen wurden zusätzlich Mückenfallen aufgestellt, die mit Kohlenstoffdioxid (CO_2) und einem synthetischen Lockstoff ausgerüstet waren. Diese Biogents (BG) Sentinel Fallen (Biogents, Regensburg, Deutschland) fangen frei herumfliegende, hungrige Mückenweibchen.

Um festzustellen, ob im Gebiet auch invasive Stechmücken der Gattung *Aedes* vorkommen, wurden Eiablagefallen (Ovitrap) aufgestellt. Diese sind für die invasiven Mücken, wie die asiatische Tigermücke (*Ae. albopictus*) oder asiatische Buschmücke (*Ae. japonicus*), besonders sensitiv [1].

Sämtliche Proben wurden anschliessend zur taxonomischen Bestimmung ins Mückenlabor des Swiss TPH gebracht. Dort wurden alle gesammelten Stechmückenstadien morphologisch bestimmt.

Als Qualitätskontrolle und wenn eine eindeutige Bestimmung nicht möglich war, wurden diese Mücken mittels einer kürzlich entwickelten massenspektrometrischen Methode (MALDI-TOF MS) identifiziert [5,6] (3.2.2). MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-flight Mass Spectrometry) ist eine Methode, bei welcher Massen von

Proteinen und andere Fragmente gemessen und gegen spezifische Spektren in einer Datenbank verglichen werden.

2.3 Sammeln der Mückenlarven

Die Stechmückenlarven wurden mit einer standardisierten Schöpfkelle (Volumen 350 ml) aus den Wasserstellen abgeschöpft. Die Suchzeit wurde je nach Grösse des Gewässers angepasst. Als Annäherung für die Grösse eines Teiches oder Tümpels wurde der maximale Durchmesser genommen.

Tabelle 1: Zeitlicher Aufwand für die Larvensuche abhängig von der Grösse der Brutstätte

Durchmesser (Meter)	Suchzeit (Minuten)
< 1	5
$1 \leq 3$	10
$3 \leq 6$	15
$6 \leq 10$	20
> 10	30

Alle beprobten Wasserstellen wurden aufgrund einer einheitlichen Ontologie [3] beim ersten Durchgang beschrieben. Das Wetter wurde in einem Feldprotokoll bei jedem Durchgang erfasst [4].

2.3.1 Ausgewählte Wasserstellen für das Sammeln der Stechmückenlarven

Die ausgewählten Wasserstellen wurden fotografiert und alle zwei Wochen nach Mückenlarven abgesucht. Die Suchdauer für die einzelnen Tümpel wurde gemäss Tabelle 1 bestimmt.



Abbildung 3: Gewässer, die nach Larven abgesucht wurden. Die Positionen sind in Tabelle 2 und Abbildung 2 angegeben.

Tabelle 2: Ausgewählte Wasserstellen, die nach Larven abgesucht wurden

Bauetappe	Stelle	Koordinaten	Beschreibung	Suchzeit (Minuten)
1+2	L-1A	N 47.28476° O 7.87070°	Stehendes Gewässer, bei viel Regen leichte Strömung möglich, teilweise besonnt	30
	L-1B	N 47.28619° O 7.87602°	Grosser Tümpel, stark besonnt. Viel Laub im Wasser, Gräser, Schilf vorhanden	30
	L-1C	N 47.28698° O 7.87455°	Stehendes Gewässer, stark mit Wasserlinsen bewachsen, umgeben von vielen hohen Gräsern, Wasser sehr klar	30
	L-1D	N 47.28633° O 7.87303°	Grosser Weiher, stark besonnt, viel Laub im Wasser, trüb	30
3	L-3A	N 47.28612° O 7.86840°	Zwei versch. Gewässer, eines meistens ausgetrocknet, anderes führte nur wenig Wasser, leichte Strömung möglich nach viel Regen	2 x 30
	L-3B	N 47.28701° O 7.87073°	Führte meistens sehr wenig Wasser, leichte Strömung nach viel Regen. Stark zugewachsen von Gräsern und Farnen, wenig Sonnenlicht	30
	L-3C	N 47.28590° O 7.87073°	Beprobung von zwei grossen Wasserstellen Ein stehendes Gewässer, stark besonnt. Zweites Gewässer mit leichter Strömung nach starkem Regen.	2 x 30
	L-3D	N 47.28447° O 7.86990°	Grosses, stehendes Gewässer, stark besonnt.	30

Als Referenzsystem für die geodätischen Koordinaten wurde das WGS 84 angewandt.

2.4 Eiablagefallen (Ovitrap) für invasive *Aedes* Arten

Um das Vorhandensein der asiatischen Buschmücke (*Ae. japonicus*) und der asiatischen Tigermücke (*Ae. albopictus*) nachzuweisen, wurden an sechs Standorten sogenannte „Ovitrap“ aufgestellt [1]. Ovitrap sind Nachahmungen natürlicher Brutstätten, die trüchtige Weibchen zur Eiablage anlocken.

Für die Überwachung der asiatischen Tiger- und Buschmücke ist es einfacher, Eier nachzuweisen als herumfliegende adulte Tiere einzufangen. Die Ovitrap ist diesbezüglich im Vorteil gegenüber den anderen hier aufgeführten Methoden und hat sich in der Vergangenheit in ähnlichen Studien bestens bewährt [1,8].

Die Ovitrap bestehen aus einem schwarzen 1.5 Liter Plastikblumentopf, der mit ca. 1.2 l Wasser gefüllt wurde (Abbildung 4). Die Weibchen legen ihre Eier typischerweise oberhalb der Wasseroberfläche ab. In der Ovitrap wurden zu diesem Zweck die Eier auf einem Holzbrettchen, welches aus dem Wasser ragt, gesammelt.

Die Holzbrettchen wurden alle zwei Wochen ausgewechselt und im Labor unter dem Binokular nach Mückeneiern abgesucht. Falls Eier vorhanden waren, wurden Stichproben oder, bei geringer Anzahl, alle Eier mit MALDI-TOF MS bis auf die Art bestimmt [5]. Die Eier verschiedener, invasiver Mückenarten unterscheiden sich morphologisch kaum.

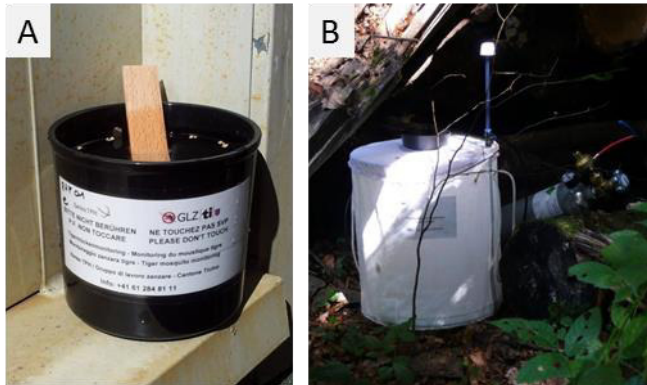


Abbildung 4: Ovitrap und BG Sentinel Falle. (A) „Ovitrap“, um Eier von invasiven Mückenarten zu sammeln. (B) BG Sentinel Falle für das Fangen von ausgewachsenen Stechmücken verschiedener Arten.

Damit die Fallen selber nicht zu potentiellen Brutstätten wurden, wurde das Wasser mit dem Bakterium *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) versetzt, welches geschlüpfte Mückenlarven abtötet und biologisch vollständig abgebaut wird [7].

2.4.1 Fallenstandorte für Eiablagefallen (Ovitrap)

Die Ovitrap wurden an sechs verschiedenen Standorten, verteilt auf das gesamte Untersuchungsgebiet, aufgestellt (Tabelle 3, Abbildung 2 und 5).

Tabelle 3: Ovitrap Standorte

Falle	Koordinaten
OT-1	N 47.28628°, O 7.87185°
OT-2	N 47.28635°, O 7.87398°
OT-3	N 47.28637°, O 7.87318°
OT-4	N 47.28510°, O 7.87065°
OT-5	N 47.28537°, O 7.87270°
OT-6	N 47.28600°, O 7.87270°

Als Referenzsystem für die geodätischen Koordinaten wurde das WGS 84 angewandt.

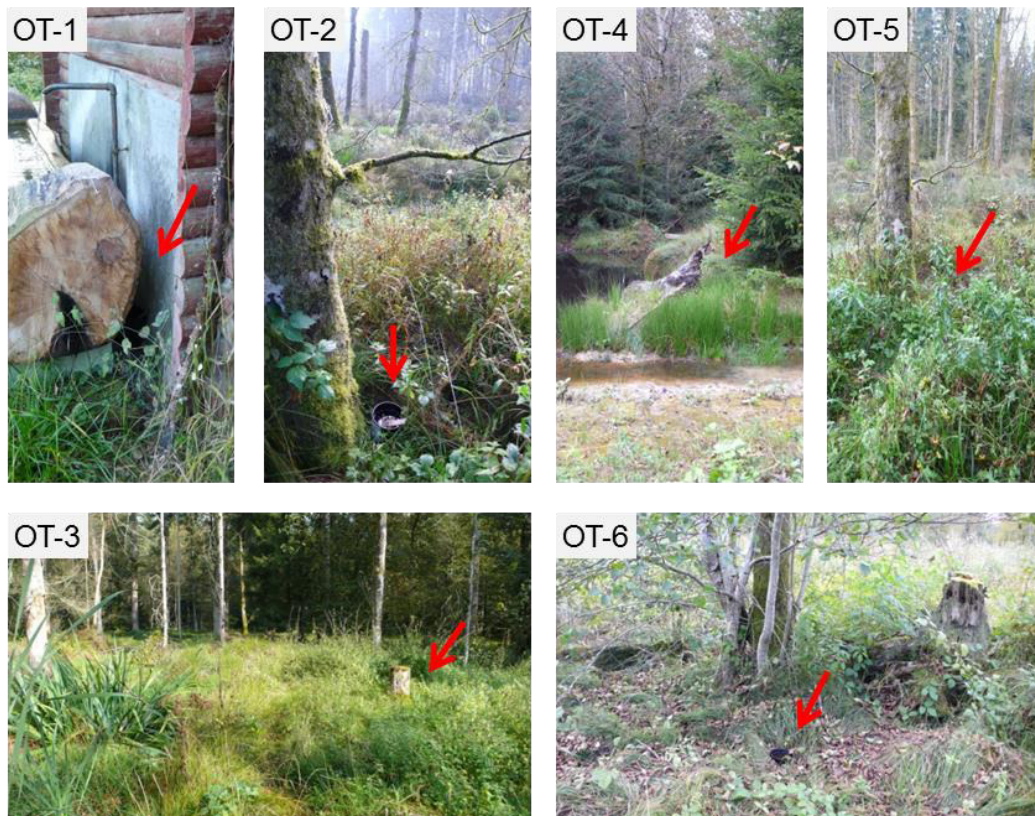


Abbildung 5: Aufnahmen der Standorte, an welchen Ovitrapps aufgestellt wurden.
Die Positionen sind in Tabelle 3 und Abbildung 2 angegeben.

2.5 Bestimmen ausgewachsener Stechmücken

Zusätzlich zu den Ovitrapps und dem Sammeln von Stechmückenlarven wurden an vier Standorten BG Sentinel Fallen (Biogents Deutschland) aufgestellt (Abbildung 4). Diese Fallen wurden neben einem künstlichen Lockstoff (BG Lure, Biogents) auch mit Kohlenstoffdioxid (CO_2) ausgerüstet, um möglichst viele, frei fliegende Stechmücken, die auf der Suche nach einer Blutmahlzeit sind, anzulocken und einzufangen. Das CO_2 lieferte eine Gasflasche, die über ein Druckventil an die Fallen angeschlossen war. Der CO_2 Durchfluss betrug 500 ml pro Stunde.

Die mit einem Akku betriebenen BG Sentinel Fallen wurden alle zwei Wochen für 24 Stunden aufgestellt. Die gesammelten Mücken wurden zur morphologischen Bestimmung ins Mückenlabor am Swiss TPH gebracht und wurden, falls sie in sehr schlechtem Zustand der Mücken waren, weiter mittels MALDI-TOF MS identifiziert.

2.5.1 Fallenstandorte der BG Sentinel Fallen

An vier unterschiedlichen Orten im Langholz wurden BG Sentinel Fallen versteckt, welche adulte, fliegende Stechmücken anlocken und einfangen sollen (Tabelle 1, Abbildung 2 und 6).

Tabelle 4: Standorte der BG Sentinel Fallen

Falle	Koordinaten
BG-1	N 47.28613°, O 7.87203°
BG-2	N 47.28590°, O 7.87071°
BG-3	N 47.28377°, O 7.87030°
BG-4	N 47.28602°, O 7.87585°

Als Referenzsystem für die geodätischen Koordinaten wurde das WGS 84 angewandt.

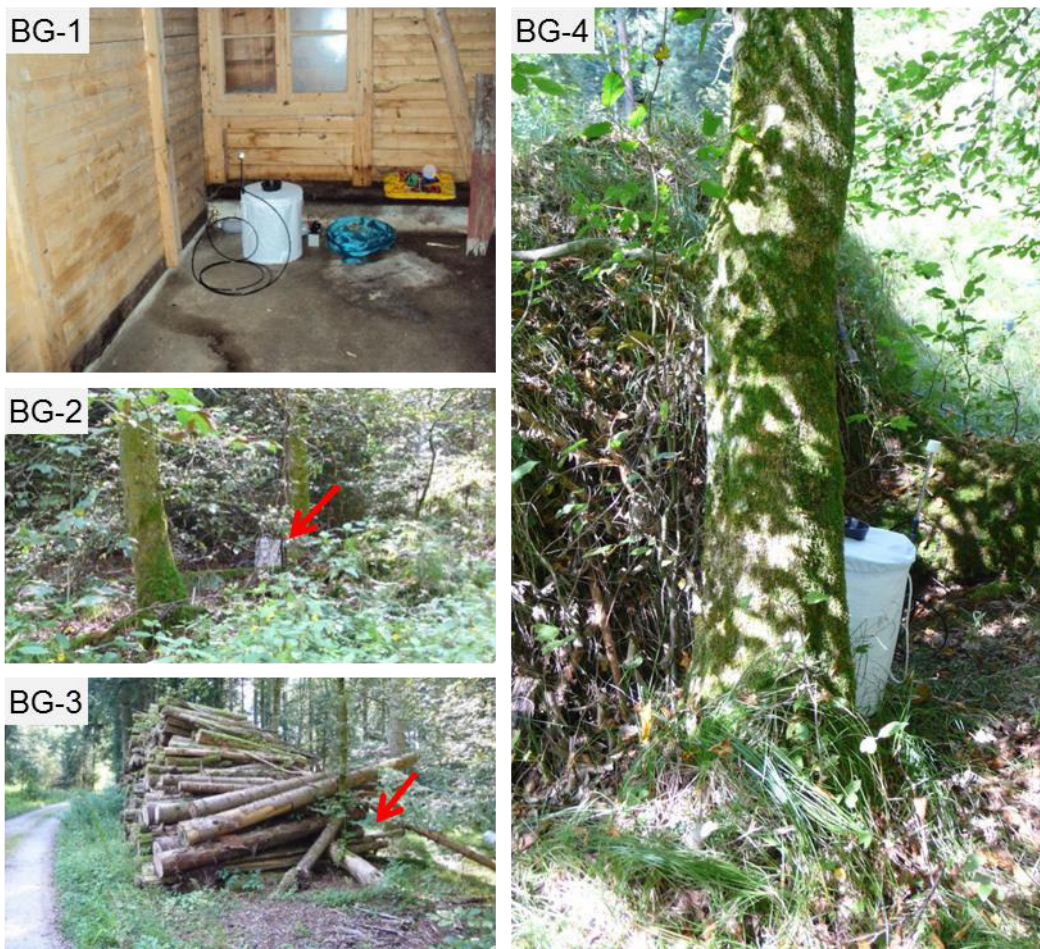


Abbildung 6: Aufnahmen der BG Sentinel Fallenstandorte. Die Positionen sind in Tabelle 4 und Abbildung 2 angegeben.

3 Bestimmung der Stechmücken

3.1 Aufzucht von kleinen Larven

Die eingesammelten Mückenlarven, welche für eine eindeutige Bestimmung noch zu klein waren, wurden in Becken (Abbildung 7) im Labor des Swiss TPH bei durchschnittlich 28.7 °C (25.6 - 29.7 °C) aufgezogen. Die Larven erhielten kleine Mengen an Fischfutter (TetraMin, Deutschland), welches zu feinem Pulver verrieben wurde. Erreichten die Stechmückenlarven das 3. oder 4. Larvenstadium, so wurden sie in 70% Ethanol konserviert und im Kühlschrank bis zur Bestimmung aufbewahrt.



Abbildung 7: Becken für die Aufzucht der Stechmückenlarven.

3.2 Bestimmung der Stechmückenarten

3.2.1 Morphologische Bestimmung

Die morphologische Bestimmung der Larven und der Adulten erfolgte unter dem Binokular (Abbildung 8) nach den Bestimmungsschlüsseln von Schaffner *et al.* [9] und Becker *et al.* [10].

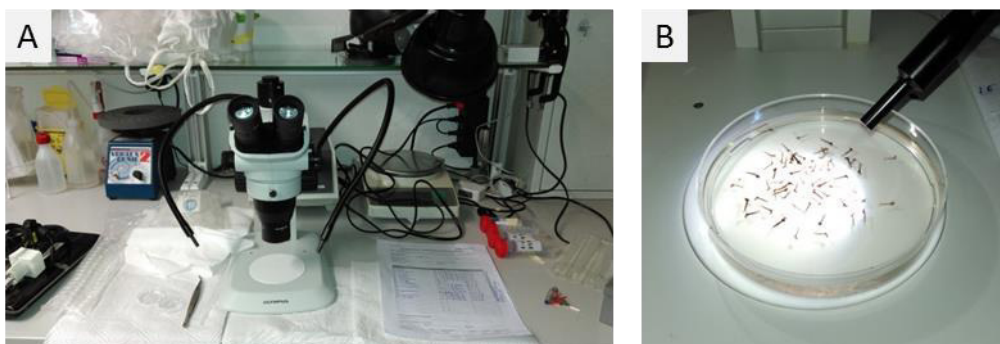


Abbildung 8: Morphologische Bestimmung unter dem Binokular. (A) Binokular. (B) Petrischale mit Mückenlarven.

Adulte und Larven wurden aufgrund eindeutiger Körpermerkmale identifiziert. Falls eine morphologische Untersuchung nicht eindeutig möglich war, wurden die Exemplare mit Hilfe

des Verfahrens, MALDI-TOF MS, gemessen und gegen Spektren in einer validierten Datenbank verglichen [5,11].

3.2.2 Bestimmung der Art mit MALDI-TOF MS

Matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) ist ein Verfahren zur Ionisation von Molekülen. Laserimpulse werden auf das Probenmaterial und die Matrix geschossen und die davonfliegenden Moleküle werden aufgezeichnet.

Für die Untersuchung mit MALDI-TOF MS wurde adulten Stechmücken das Abdomen abgetrennt und nur Thorax, Kopf und Beine verwendet. Im Abdomen würden die Proteine, welche von einer Blutmahlzeit stammen könnten, die Auswertung erschweren.

Bei Stechmückenlarven wurde nur der Kopf und Thorax verwendet. In diesem Fall war nicht eine mögliche Blutmahlzeit der Grund für die Abtrennung des Abdomens, sondern der hohe Fettgehalt (Lipide), welcher das Resultat beeinträchtigen würde.

Das zu untersuchende Material wurde in Ameisensäure aufgelöst, auf die Platte aufgetragen und mit Sinapinsäure versehen (Abbildung 9).

Die Mückenpräparationen und MALDI-TOF MS Messungen wurden bei der Firma Mabritec AG in Riehen, Basel-Stadt, durchgeführt.

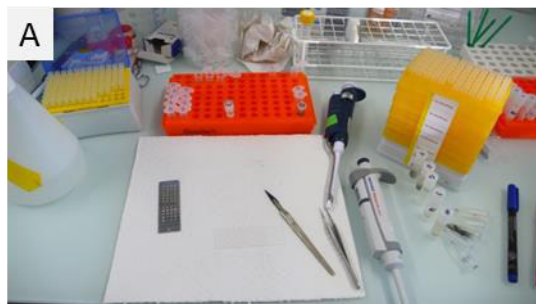


Abbildung 9: Präparation der Proben für die MALDI-TOF MS Messungen. (A) Vorbereitung der Larve bzw. Adulttier. (B) Platte mit aufgetragenen Proben, bereit für die Messungen.

4 Resultate und Diskussion

An vier zufällig ausgewählten Orten in Bauetappe 1+2 und Bauetappe 3 wurden Mückenlarven gesammelt (Abbildung 2). Die Probennahmen wurden zwischen dem 14. Juli und 7. Oktober 2014 durchgeführt und jeweils alle zwei Wochen wiederholt, sofern kein Regenwetter angesagt war. Bei Regen wurden die Beprobungen am nächstmöglichen Tag fortgesetzt. Dies war nötig, da Mückenlarven sehr empfindlich auf Bewegungen der Wasseroberfläche reagieren und das Einfangen massiv erschwert worden wäre.

An vier weiteren Standorten wurden die BG Sentinel Fallen aufgestellt (Abbildung 2), welche mit einer angeschlossenen CO₂-Flasche sowie einem künstlichen, volatilen Lockstoff (BG Lure, Biogents, Deutschland) ausgestattet waren. Mit den BG Sentinel Fallen wurden blutsuchende Mückenweibchen angelockt und eingefangen. Weil anfänglich Probleme mit der CO₂ Versorgung der Fallen aufgetreten waren, wurden zusätzlich auch noch Fallen zwischen dem zweiten und dritten Rundgang am 4. August 2014 aufgestellt.

Um gezielt nach invasiven Mückenarten der Gattung *Aedes* zu suchen, wurden Ovitrap (Abbildung 4) an sechs verschiedenen Standorten aufgestellt (Abbildung 2). Diese Fallen

wurden am 14. Juli erstmals platziert. Alle zwei Wochen wurden die Holzstäbchen ausgetauscht und im Labor mittels Binokular auf Eier untersucht.

Aufgrund der Anzahl neu hinzukommender Arten in Abhängigkeit der durchgeführten Beprobungen gehen wir davon aus, dass die meisten vorhandenen Mückenarten gefunden wurden, die mit der vorliegenden Methode gefangen werden können. Dies wird durch die Kurve in Abbildung 10 verdeutlicht. Die Kurve zeigt die kumulative Anzahl der Arten für jede Runde und erreichte, sowohl bei den Larven, wie auch bei den adulten Stechmücken, ein Plateau bereits in der drittletzten Runde.

4.1 Räumliche und zeitliche Verteilung der Stechmückenarten

In der Untersuchungsperiode vom 14. Juli bis 7. Oktober 2014 wurden während sieben Erhebungen insgesamt 1'849 Stechmücken gesammelt und ausgewertet. Davon waren 21 Eier, 1'745 Larven und 83 Adulte (Tabelle 5). Von den 1'849 Stechmücken konnten 152 Exemplare (8.2%) nicht identifiziert werden. Diese waren entweder in einem schlechten Zustand oder produzierten nicht interpretierbare Spektren in der MALDI-TOF MS Analyse. Mit Ausnahme der meisten Ovitraps wurden an allen Standorten Stechmücken gefangen.

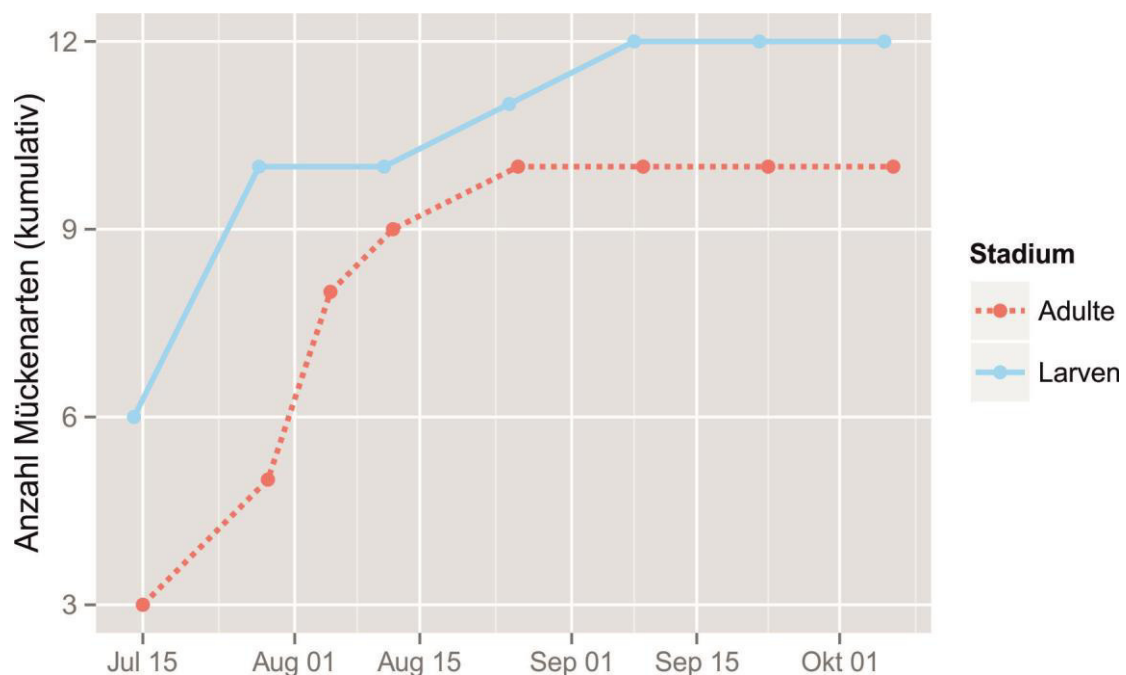


Abbildung 10: Neu hinzukommende Mückenarten in Abhängigkeit von der Anzahl Probenahmen. Sowohl beim Sammeln der Mückenlarven, wie auch beim Fangen der Adulttiere mit den BG Sentinel Fallen, erreichte die kumulative Häufigkeit der neu hinzukommenden Arten ein Plateau. Dies deutet darauf hin, dass die meisten Arten, welche mit diesen Fangmethoden gesammelt werden können, auch tatsächlich gefangen wurden.

In dieser Studie wurden 17 verschiedene Taxa identifiziert (Tabelle 5). Dies entspricht fast der Hälfte der bisher 36 in der Schweiz beschriebenen und bestätigten Mückenarten [12]. Im Vergleich zur Studie von Schaffner und Mathis [12] sind 17 Arten viel. In ihrer Studie wurden an acht natürlichen Standorten jeweils 6 bis 14 Arten gefunden.

Einige Stechmücken konnten mit den angewandten Methoden nicht auf Artebene bestimmt werden, da sie sich morphologisch nicht oder nur sehr geringfügig unterscheiden. Darunter

waren vier Gruppen mit solchen Geschwisterarten: *Aedes annulipes/cantans*, *Ae. cinereus/geminus*, *Culex pipiens/torrentium* und der *Anopheles maculipennis* Artenkomplex. Der *Anopheles maculipennis* Komplex enthält mindestens neun verschiedene Arten. Davon wurden in der Schweiz bisher aber nur zwei Arten beschrieben, *An. maculipennis* s.s. und *An. messeae* [13]. Während *An. maculipennis*, *Ae. annulipes/cantans* und *Ae. cinereus/geminus* weder morphologisch noch mit MALDI-TOF MS auseinander gehalten werden können, unterscheiden sich die MALDI-TOF MS Spektren zwischen *Cx. pipiens* von *Cx. torrentium*. In dieser Studie wurden sowohl *Cx. pipiens* wie auch *Cx. torrentium* nebeneinander identifiziert. Diese sind hier als eine Kategorie aufgeführt, da nicht alle Individuen mit MALDI-TOF MS bestimmt werden konnten.

Die häufigsten Arten waren *An. maculipennis* s.l., *Cx. martinii* und *Cx. pipiens/torrentium*. Aber auch *An. claviger* und *An. territans* waren relativ häufig (Tabelle 5 und 6). *Ae. sticticus*, *Coquilletidia richardii* und *Culiseta morsitans* wurden nur im Adultstadium gefangen. Dagegen wurden fünf *Culex* Arten nur im Larvenstadium gefangen: *Cx. hortensis hortensis*, *Cx. martinii*, *Cx. territans* und *Cx. theileri*.

Tabelle 5: Anzahl gefangener Stechmücken getrennt nach Bauetappe und Entwicklungsstadium.

Mückenart	Bauetappe 1+2		Bauetappe 3			Total
	Larven	Adulte	Eier	Larven	Adulte	
<i>Aedes annulipes/cantans</i> ¹	1	0	0	0	11	12
<i>Aedes cinereus/geminus</i> ¹	4	0	0	0	10	14
<i>Aedes geniculatus</i>	0	0	0	15	0	15
<i>Aedes japonicus</i>	0	0	21	0	0	21
<i>Aedes sticticus</i>	0	1	0	0	0	1
<i>Anopheles claviger</i>	44	0	0	31	2	77
<i>Anopheles maculipennis</i> Komplex ¹	310	0	0	227	4	541
<i>Anopheles plumbeus</i>	2	11	0	1	10	24
<i>Coquilletidia richardii</i>	0	5	0	0	1	6
<i>Culex hortensis hortensis</i>	3	0	0	27	0	30
<i>Culex martinii</i>	252	0	0	99	0	351
<i>Culex pipiens/torrentium</i> ²	200	15	0	176	7	398
<i>Culex territans</i>	133	0	0	31	0	164
<i>Culex theileri</i>	14	0	0	14	0	28
<i>Culiseta annulata</i>	9	1	0	0	0	10
<i>Culiseta morsitans</i>	0	3	0	0	2	5
Nicht bestimmt	72	0	0	80	0	152
Total	1'044	36	21	701	47	1'849

¹ Nahe verwandte Mückenarten, die nicht voneinander unterschieden werden konnten, wurden in derselben Kategorie zusammengefasst.

² Aufgrund der MALDI-TOF MS Analysen wissen wir, dass sowohl *Culex pipiens* wie auch *Cx. torrentium* in den Proben vorhanden waren. Die beiden Arten konnten morphologisch nicht eindeutig voneinander unterschieden werden, deshalb sind sie in hier in einer Kategorie zusammengefasst.

Neben den einheimischen Arten wurde auch eine invasive *Aedes* Art entdeckt. Zwischen dem 8. und 22. September 2014 fing die Ovitrap OT-4 (Abbildung 2) 21 Eier der asiatischen

Buschmücke (*Ae. japonicus*). Die asiatische Buschmücke, die häufig mit der asiatischen Tigermücke (*Ae. albopictus*) verwechselt wird (Abbildung 11), wurde bereits vermehrt im schweizerischen Mittelland gefunden [8,12,14].

Während die Gattung *Aedes* vor allem im August und September präsent war, wurden die Vertreter der Gattung *Anopheles* in allen Beprobungsrunden entdeckt, wie auch einige der *Culex* Arten (Abbildung 12). *Cq. richardii* war nur von Ende Juli bis Ende August vorhanden. Einige Arten, wie z.B. *Ae. sticticus*, kamen nur während einer einzigen Beprobung vor, deshalb erscheinen sie in Abbildung 12 nur einmal. Diese Ergebnisse sollten mit Vorsicht interpretiert werden. Es könnte auch sein, dass die Fangmethoden für gewisse Arten zu wenig sensitiv waren.

Die Anzahl gesammelter Arten zwischen den beiden Bauetappen lagen in ähnlichem Rahmen (Abbildung 13). In beiden Bauetappen wurden je 15 von insgesamt 17 verschiedenen Arten gefunden (Tabelle 5 und 6). Die Arten, die nur in Bauetappe 1+2 gefangen wurden, waren *Ae. sticticus* und *Cs. annulata*. Die beiden Arten *Ae. japonicus* und *Ae. annulipes/cantans* wurden hingegen nur in der Bauetappe 3 entdeckt. Der Unterschied der beiden Bauetappen war nicht signifikant¹. Vermutlich liegen die Bauetappen geographisch, wie auch zeitlich, zu nahe aufeinander, um mit der angewandten Methode Unterschiede auf dieser Ebene feststellen zu können.

Tabelle 6: Stechmückenarten und ihre Häufigkeit im Naturwaldreservat Langholz nach Bauetappe und Entwicklungsstadium. Die Zahlen geben an, in wie vielen Probenahmen eine bestimmte Art vorkam.

Mückenart	Bauetappe 1+2			Bauetappe 3		
	Eier	Larven	Adulte	Eier	Larven	Adulte
<i>Aedes annulipes/cantans</i> *	-	-	-	-	-	5
<i>Aedes cinereus/geminus</i> *	-	1	-	-	-	6
<i>Aedes geniculatus</i>	-	2	-	-	3	-
<i>Aedes japonicus</i>	-	-	-	1	-	-
<i>Aedes sticticus</i>	-	-	1	-	-	-
<i>Anopheles claviger</i>	-	10	-	-	10	2
<i>Anopheles maculipennis sensu lato</i> *	-	14	-	-	29	4
<i>Anopheles plumbeus</i>	-	1	-	-	1	5
<i>Coquilletidia richardii</i>	-	-	4	-	-	1
<i>Culex hortensis hortensis</i>	-	1	-	-	2	-
<i>Culex martinii</i>	-	12	-	-	6	-
<i>Culex pipiens/torrentium</i> *	-	7	5	-	6	5
<i>Culex territans</i>	-	20	-	-	9	-
<i>Culex theileri</i>	-	2	-	-	1	-
<i>Culiseta annulata</i>	-	2	1	-	-	-
<i>Culiseta morsitans</i>	-	-	3	-	-	2

* Nahe verwandte Mückenarten, die nichtvoneinander unterschieden werden konnten, wurden in derselben Kategorie zusammengefasst.

¹ Die Anzahl der Arten wurde zwischen den Bauetappen mit einem Generalised Linear Mixed Effect Modell verglichen. Im Modell war die Anzahl der Arten die abhängige Variable und die Bauetappe die unabhängige Variable. Für die lineare Verknüpfung der beiden Variablen wurde eine log-Poisson Link Funktion verwendet. Da die Erhebungen an denselben Stellen wiederholt wurden, und dadurch die jeweiligen Beobachtungen miteinander korreliert sind, wurde die Beprobungsrunde als zufälliger Faktor modelliert.

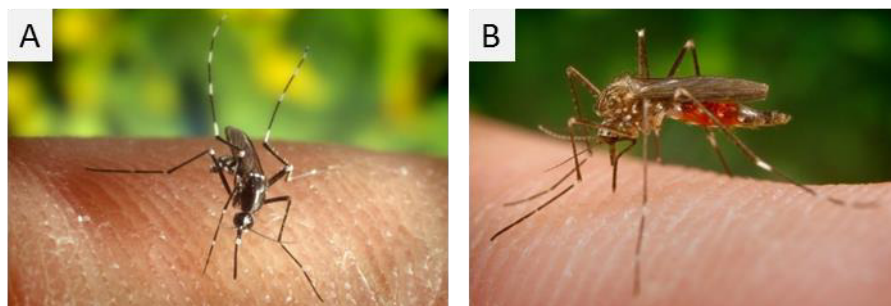


Abbildung 11: Invasive *Aedes* Arten in der Schweiz. (A) Asiatische Tigermücke (*Ae. albopictus*). (B) Asiatische Buschmücke (*Ae. japonicus*). Aufgrund ihrer Ähnlichkeit wird die asiatische Buschmücke in der Bevölkerung oft mit der der asiatischen Tigermücke verwechselt. Quelle: James Gathany, CDC Public Health Image Library.

	Jul.	Aug.	Sep.	Okt.
<i>Aedes annulipes/cantans</i> *				
<i>Aedes cinereus/geminus</i> *				
<i>Aedes geniculatus</i>				
<i>Aedes japonicus</i>				
<i>Aedes sticticus</i>				
<i>Anopheles claviger</i>				
<i>Anopheles maculipennis</i> Komplex*				
<i>Anopheles plumbeus</i>				
<i>Coquilletidia richardii</i>				
<i>Culex hortensis hortensis</i>				
<i>Culex martinii</i>				
<i>Culex pipiens/torrentium</i> *				
<i>Culex territans</i>				
<i>Culex theileri</i>				
<i>Culiseta annulata</i>				
<i>Culiseta morsitans</i>				

Abbildung 12: Zeitliches Vorkommen von Stechmückenarten im Naturwaldreservat Langholz. Das Vorhandensein der verschiedenen Stechmückenarten ist hier durch farbige Schattierungen dargestellt. Bei den weissen Kästchen wurden keine Larven der entsprechenden Arten gefunden. Für diese Abbildung wurden die Daten der verschiedenen Entwicklungsstadien (Eier, Larven und Adulte) zusammengefasst. Die verschiedenen Farben repräsentieren die verschiedenen Gattungen. * Nahe verwandte Mückenarten, die nicht voneinander unterschieden werden konnten, wurden in derselben Kategorie zusammengefasst.

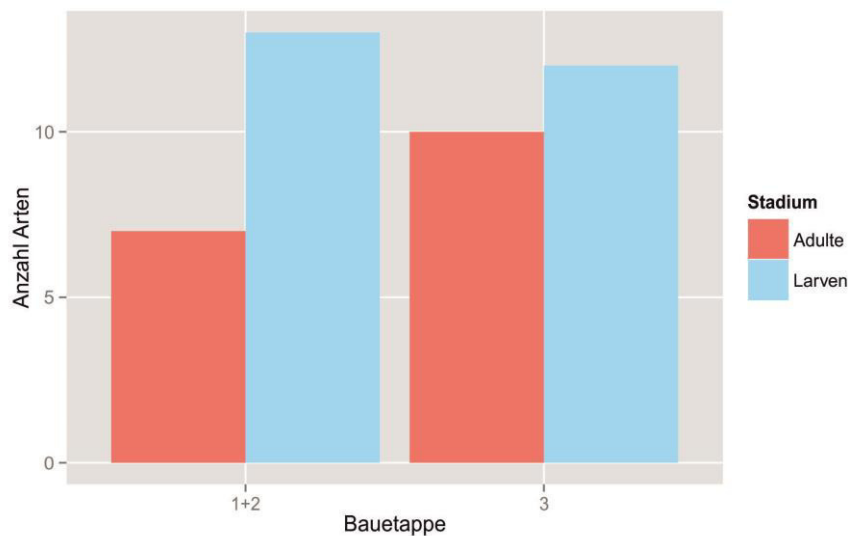


Abbildung 13: **Anzahl Mückenarten im Naturwaldreservat Langholz getrennt nach Bauetappen.**

4.2 Relevanz der einzelnen Stechmückenarten für die Besucher des Langholzes

Einige der im Langholz vorkommenden Arten, sind potentielle Überträger von pathogenen Viren und Parasiten, sowohl beim Menschen wie auch beim Tier (Tabelle 7).

Mehrfach wurden die *Anopheles* Arten *An. claviger*, *An. maculipennis* und *An. plumbeus* gefunden. Diese Arten spielten in der Vergangenheit eine Rolle in der Übertragung von Malaria, bis diese in West- und Südeuropa während des 19. und anfangs des 20. Jahrhunderts verschwand [15]. Faktoren, die zu dem Verschwinden der Malaria beitrugen, waren verbesserte Wohnverhältnisse, insbesondere die Trennung von Stallungen und Wohnräumen, der Einsatz von Medikamenten, die Trockenlegung von Brutstätten und der Einsatz von Insektiziden in der Mückenbekämpfung. Der in Europa wohl am häufigsten vorkommende Malariaerreger war sehr wahrscheinlich *Plasmodium vivax*. *P. vivax* führte damals, zusammen mit anderen Faktoren, zu einer erheblichen Sterblichkeit. Unter heutigen Bedingungen führt *P. vivax* in der Regel zu weniger gravierenden Erkrankungen. Dagegen führt der vorwiegend in den tropischen Ländern verbreitete Parasit, *P. falciparum*, zur lebensbedrohlichen Malaria tropica. Von den im Naturwaldreservat Langholz identifizierten *Anopheles* Mücken könnte *An. plumbeus* auch *P. falciparum* übertragen [16]. Damit eine Übertragung der Malaria stattfinden könnte, bräuchte es neben einem Stich bei einer infektiösen Person durch eine Malariaemücke auch eine längere Wärmeperiode, damit der Parasit seinen Entwicklungszyklus in der Mücke durchlaufen könnte und die Mücke infektiös würde. Dann müsste diese Mücke eine weitere Person stechen. Nur so kann eine Malariaübertragung stattfinden. Tatsächlich gab es in Duisberg, Deutschland, einen solch aussergewöhnlichen Fall einer lokalen Übertragung von *P. falciparum* durch *An. plumbeus* [17]. Dort war der Ursprung ein aus Angola hospitalisiertes Kind mit einer chronischen *P. falciparum* Infektion. Aber im Gegensatz zu diesem Einzelfall aus einem Spital scheint eine Malariaübertragung im Naturwaldreservat Langholz sehr unwahrscheinlich und nicht wahrscheinlicher als an anderen Orten, wie das Beispiel aus Duisburg zeigt, da eine Malariaübertragung nur von einer erkrankten Person ausgehen kann.

Einige der im Langholz gefundenen Arten können Viren übertragen. Ein solches mückenübertragenes Virus ist das West-Nil-Virus. Das West-Nil-Virus wurde aber in der Schweiz

bisher nicht nachgewiesen, jedoch in den Nachbarländern Österreich und Italien. Es wäre denkbar, dass in Zukunft das West-Nil-Virus auch in der Schweiz eine Rolle spielen könnte. Unklar ist noch, welche Auswirkungen das Aufkommen der invasiven, asiatischen Buschmücke auf die Artenzusammensetzung der Stechmücken im Langholz und in der Schweiz haben wird. Wenn auch die medizinische und ökologische Bedeutung der asiatischen Buschmücke unklar ist, könnte eine Zunahme dieser Mückenart zu einer erhöhten Belästigung durch Mückenstiche für die Waldbesucher führen. Dies speziell, weil diese Mückenart tagsüber aktiv ist und so eher mit dem Menschen in Kontakt kommt. Generell ist die Antwort auf die Auswirkung der Wiedervernässung auf die Belästigung durch Mückenstiche noch offen und könnte Gegenstand einer weiterführenden Arbeit sein.

Tabelle 7: Klassifizierung der Stechmücken im Langholz in Bezug auf ihre potentielle Gefahr als Krankheitsüberträger. Die Relevanz bezieht sich auf die Vektorkompetenz, also für die Übertragung von Viren (Arboviren), Malaria, Pathogenen bei Tieren, sowie die Bedrohung der Biodiversität bei invasiven Arten. Dabei bedeutet ein Wert von 3 oder höher, dass die Art für diese Kategorie relevant ist. Die Einstufung der Relevanz wurde von Schaffner und Mathis übernommen [14] und ist dort im Detail beschrieben.

Art	Bevorzugtes Brutgebiet	Stech-aktivität	Wirt	Relevanz			
				Arboviren	Malaria	Tiere	Biodiversität
<i>Anopheles claviger</i>	Fast überall, bevorzugen sauberes Wasser	In Häusern und draussen	Mensch, Vieh	3	4	5	
<i>An. maculipennis</i> s.s.	Geschützte, ruhige Gewässer	Nur draussen	Mensch, Vieh	1	3	5	
<i>An. plumbeus</i>	Baumhöhlen, Wald Kontainer, ländliche Gebiete	Draussen, Waldränder	Mensch, Säugetiere	2	3	2	
<i>Ae. japonicus</i>	Kleine Tümpel, Container, Friedhofvasen	Draussen	Säugetiere, Vögel	3		3	3
<i>Culex martinii</i>	Wald, sumpfiges Gebiet	Unbekannt	nicht bekannt				
<i>Cx. pipiens (pipiens)</i>	Baumhöhlen, alle Arten von Gewässer	Draussen	Säugetiere	5		5	
<i>Cx. territans</i>	Teiche, Weiher, Bäche mit schwacher Strömung	Draussen	Amphibien, Reptilien, Vögel				
<i>Culiseta morsitans</i>	Teiche, Gräben, Bäche mit schwacher Strömung	Draussen	Vögel, Reptilien, Säugetiere	4		1	
<i>Cs. theileri</i>	Bäche, Gräben, Entwässerungskanäle, Container	Drinnen und draussen	Tiere, Mensch	4		1	

5 Schlussfolgerungen

Das Naturwaldreservat Langholz bietet zahlreichen Stechmückenarten passende Brutgebiete. Dies schlägt sich in einer grossen Artenvielfalt nieder. Wir konnten 17 von 36 in der Schweiz beschriebenen Stechmückenarten im Langholz finden, was einer überdurchschnittlich hohen Artenvielfalt entspricht. Die Artenvielfalt war zwischen den beiden Bauetappen vergleichbar.

Stechmücken dienen vielen Tierarten als Nahrung, sei dies im Larvenstadium im Wasser oder als fliegende Adulttiere. Stechmückenlarven im Wasser werden zum Beispiel von Ruderfusskrebse, Fischen, Libellenlarven, Fröschen, Unken, Molchen und Salamandern verspeist. Die adulten Stechmücken dienen diversen Amphibien (Fröschen, Kröten, Unken) und Vögeln als Nahrungsquelle.

Einige der vorhandenen Stechmücken bevorzugen den Menschen als Wirt für ihr Blutmahl. Mit dem Blutmahl können diese auch diverse Krankheiten übertragen, sofern diese Mücken bei einem früheren Blutmahl mit einem Virus oder Malaria infiziert wurden. Stechmücken der Gattung *Culex*, wie die hier gefundenen *Culex pipiens* und *Culex theileri*, sind bekannt als Überträger von West-Nil- und anderen Viren. Auch die malariaübertragenden *Anopheles plumbeus* und *An. claviger* wurden gefunden. Jedoch wird die Wahrscheinlichkeit einer Malariaübertragung im Naturwaldreservat Langholz als sehr gering eingeschätzt.

Neben den einheimischen Stechmücken haben wir auch die invasive, asiatische Buschmücke (*Ae. japonicus*) entdeckt. Im Vergleich zur asiatischen Tigermücke (*Ae. albopictus*) wird diese Art als Krankheitsüberträger für den Menschen als weniger relevant eingestuft. Die asiatische Buschmücke könnte jedoch bei höheren Dichten zu einer starken Belästigung für Waldbesucher werden, da sie auch tagsüber aktiv ist.

6 Empfehlungen

Wir haben im Langholz eine grosse Vielfalt an Stechmückenarten gefunden und einige davon könnten verschiedene Viren, oder bei sehr warmen Sommermonaten, Malaria auf den Menschen übertragen, sofern diese durch ein Blutmahl infiziert wären. Zudem konnte auch die invasive, asiatische Buschmücke (*Ae. japonicus*) nachgewiesen werden. Da die Wiedervernässung erst seit kurzem besteht, ist noch unklar, ob und wie sich die Situation in naher Zukunft verändern wird. Deshalb würden wir ein reduziertes Langzeitmonitoring für das Gebiet, mit Einbezug von Vergleichsflächen ohne Wiedervernässung, empfehlen.

Das Langholz wird als Naherholungsgebiet rege genutzt, sei dies von Spaziergängern, Joggern, Bikern oder anderen wald- und naturverbundenen Mitmenschen. Im Sinne einer Interessensabwägung zwischen Naturschutz und Freizeitnutzung wäre eine Erhebung der effektiven Belästigung durch Mückenstiche im und um die Wiedervernässungszone nützlich.

7 Danksagung

Wir bedanken uns herzlich für die wertvolle Zusammenarbeit mit Stefanie Burger, Franziska Kaiser und Marcel Murri mit Team. Danke für den Zugang zur Staatswaldhütte und die Fahrerlaubnis zum Langholz.

Wir bedanken uns beim zuständigen Förster Hansrudolf Fischer und dem zuständigen Jagdaufseher Harry Burgherr.

Grosser Dank gebührt Lea Grass von der Abteilung Wald für die grossartige Zusammenarbeit im Wald beim Fallen stellen und abbauen sowie dem Sammeln von Stechmückenlarven.

Danke auch den Helfern, welche durch einen einmaligen Einsatz im Langholz zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben: Noëmi Brüggemann (Abteilung Wald), Nikita Lysenko (Swiss TPH), Henry Owusu (Swiss TPH), Salome Keller (Swiss TPH), Lea Colucci.

Wir bedanken uns bei Valentin Pflüger und Dominik Ziegler, der Firma Mabritec AG, für die massenspektrometrischen Analysen.

8 Literaturverzeichnis

1. Rakotoarivony, L.M. und Schaffner, F. (2012) ECDC guidelines for the surveillance of invasive mosquitoes in Europe. *Eurosurveillance* 17: 29.
2. R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <http://www.R-project.org/>.
3. Delarze R., Gonseth Y., Galland P. (2008): Lebensräume der Schweiz. Ökologie - Gefährdung - Kennarten. Auflage: 2. überarbeitete, aktualisierte Auflage. Bern: Ott Verlag.
4. Suter, T. (2011) A Field Survey of Biting Mosquitoes in the Greater Area of the Euro Airport Basel-Mulhouse: A Mapping Project. MSc Thesis, University of Basel.
5. Schaffner F., Kaufmann C., Pflüger V., Mathis A. (2014): Rapid protein profiling facilitates surveillance of invasive mosquito species. *Parasites and Vectors* 7: 142.
6. Müller P., Pflüger V., Wittwer M., Ziegler D., Chandre F., Simard F., Lengeler C. (2013) Identification of cryptic *Anopheles* mosquito species by molecular protein profiling. *PLoS ONE* 8: e57486.
7. Guidi V., Patocchi N., Lüthy P., Tonolla M. (2011) Distribution of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in soil of a Swiss wetland reserve after 22 years of mosquito control. *Applied Environmental Microbiology* 77: 3663–3668.
8. Müller P., Engeler, L., Tonolla M. (2013) Vorprojekt Nationales Programm zur Überwachung der asiatischen Tigermücke – Alpennordseite und Wallis. Basel: Swiss TPH.
9. Schaffner F., Angel G., Geoffroy B., Hervy J.-P., Rhaim A., Brunhes J. (2001) The Mosquitoes of Europe. An identification and training programme. Didactiques. IRD Editions & EID Méditerranée: Montpellier. CD-Rom.
10. Becker N., Petric D., Zgomba M., Boase C., Madon M., Dahl C., Kaiser A.: Mosquitoes and Their Control. 2nd ed. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
11. Müller P., Pflüger V., Wittwer M., Ziegler D., Chandre F., Simard F., Lengeler C.: Identification of cryptic *Anopheles* mosquito species by molecular protein profiling. *PLoS ONE* 8: e57486.
12. Schaffner F, Mathis A (2013) Spatio-temporal diversity of the mosquito fauna in Switzerland (2011-2012): Institute of Parasitology, University of Zurich: 19.

13. Briegel H., Kaeslin M., Proft J. (2002) *Anopheles maculipennis* complex in Switzerland: reassessing taxonomic status and malaria potential. *Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft* 75: 119–125.
14. Schaffner F., Kaufmann C., Hegglin D., Mathis A. (2009) The invasive mosquito *Aedes japonicus* in Central Europe. *Medical and Veterinary Entomology* 23: 448–451.
15. Geigy, R. (1945) Malaria in der Schweiz. *Acta Tropica* 1: 1-15.
16. Schaffner F., Thiéry I., Kaufmann C., Zettor A., Lengeler C., Mathis A., Bourgouin C. (2012) *Anopheles plumbeus* (Diptera: Culicidae) in Europe: a mere nuisance mosquito or potential malaria vector? *Malaria Journal* 11: 393.
17. Krüger A., Rech A., Su X.-Z., Tannich E. (2001) Two cases of autochthonous *Plasmodium falciparum* malaria in Germany with evidence for local transmission by indigenous *Anopheles plumbeus*. *Tropical Medicine and International Health* 6: 983–985.

Chapter 4

Evaluation of standard field and laboratory methods to compare protection times of the topical repellents PMD and DEET



Human landing catch (HLC), Langholz 2015

Evaluation of standard field and laboratory methods to compare protection times of the topical repellents PMD and DEET

Barbara Colucci^{1,2} and Pie Müller^{1,2} *

¹Epidemiology and Public Health Department, Swiss Tropical and Public Health Institute, Socinstrasse 57, PO Box, CH-4002 Basel, Switzerland

²University of Basel, Petersplatz 1, CH-2003 Basel, Switzerland

*Corresponding author: pie.mueller@swisstph.ch

Abstract

Mosquitoes are important vectors of pathogens and travellers to disease endemic countries are advised to avoid bites by applying topical repellents. Topical repellents are typically tested either in the arm-in-cage (AIC) test under laboratory conditions or in the field, but not often under both conditions. We, therefore, investigated how two topical repellents, 15% *para*-Menthane-3,8-diol (PMD) (DEET) and 15% *N,N*-Diethyl-3-methylbenzamide compare against each other both in the AIC test against three species recommended by the World Health Organization (i.e. *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus*) and at two field sites in Switzerland, while using the same study participants for both experiments. In the field, the median complete protection time (CPT) was at least 6 hours for both PMD and DEET, while in the AIC test DEET slightly outperformed PMD. CPTs for DEET in the AIC test were 0.5, 2 and 2 hours against *Ae. aegypti*, *An. stephensi* and *Cx. quinquefasciatus*, respectively and the corresponding median CPTs for PMD were 0.5, 1 and 0.5 hours. In conclusion, DEET slightly outperformed PMD in the AIC test, while the observed landing rates suggest the AIC test to underestimate efficacy of topical repellents in areas with lower landing pressure.

Introduction

Biting mosquitoes (Diptera, Culicidae) are important vectors of several diseases such as malaria, filariasis and arboviral infections, including dengue, West-Nile, chikungunya and Zika, mainly in the tropical and subtropical regions but also increasingly in Europe as recent autochthonous cases of dengue and chikungunya have shown¹⁻⁴. For most of the mosquito-

borne diseases neither vaccines nor specific treatments exist and, therefore, travellers to disease endemic countries are advised to avoid mosquito bites, primarily by wearing appropriate clothing and by applying topical repellents on the bare skin. Topical repellents may provide good protection against mosquito bites over several hours depending on the active ingredient and its concentration⁵⁻⁹.

The most widely used active ingredient in commercially available mosquito repellents is the synthetic compound *N,N*-diethyl-3-methylbenzamide (DEET) which is generally regarded as the “gold standard” due to its high efficacy against a broad range of insects^{10,11}. Although DEET is deemed nontoxic if used correctly, concerns have been raised about its safety¹². Moreover, DEET has plasticising properties, a strong smell and may even cause discomfort, particularly when applied at higher dosages. Users may, therefore, wish to buy repellents containing alternative actives. An alternative compound which has been shown to be effective against a range of mosquito species is *para*-menthane 3,8-diol (PMD)^{13,14}. PMD originates from the residuum of the hydrodistillation of the leaves of the lemon eucalyptus tree (*Corymbia citriodora*) but may also be produced synthetically.

Several studies have compared the efficacy of PMD against DEET, yet the existing data are somewhat difficult to read because the formulations tested were either commercially available products, containing additional compounds that potentially also influence the efficacy of the repellent¹⁵, or the concentrations of PMD and DEET of the formulations applied within the same study differed^{16,17}, or both^{14,15,18,19}. Some studies had also very low sample size including only 3 or even fewer study participants^{15,16,18} casting doubts on the generalisation of these results to a wider population.

The efficacy of topical mosquito repellents is usually tested following various national or international guidelines (e.g. ^{20,21}). Under laboratory conditions, the efficacy of mosquito repellents is typically evaluated in the so-called “arm-in-cage” (AIC) test. In the AIC test, according to the guidelines, a forearm of a study participant is treated with a defined amount of the repellent formulation (e.g. 1.67 µl per cm²). Then the participant exposes the treated forearm at regular intervals (e.g. every half hour) to a number (e.g. 200) of host-seeking female mosquitoes for a defined exposure period (e.g. 3 minutes) in a cubic cage (e.g. 64,000 cm³). The endpoint is then usually the complete protection time (CPT) or the relative protection (%*p*). CPT corresponds to the time from the application of the formulation until its failure and the relative protection is the percentage protection provided as compared to an untreated forearm. In the field, similar endpoints may be determined on the basis of mosquitoes landing or biting on an exposed skin area, usually the lower leg, while the mosquitoes are collected by aspiration allowing for the identification of the mosquito species in a laboratory.

While the guidelines recommend conducting efficacy studies both under laboratory and field conditions, mosquito repellents are hardly being compared side-by-side in both settings. For example, searching the literature database PubMed for insect repellents using the Medical Subject Headings terms “insect repellents”, “Culicidae” and “terpin”, which includes PMD, together with the published studies mentioned in the review of Carroll & Loye²² yields 9 studies done either in the laboratory (N=4)^{16,23-25} or in the field (N=5)^{13,16,17,26,27} but only 1 study that evaluated the repellent’s efficacy under both laboratory and field conditions²². This raises the question as to how protection efficacy measured under laboratory conditions compares to the efficacy under real conditions of use. A better understanding of this relationship would allow for validating and optimising existing laboratory assays, particularly since field studies are time and cost intensive.

In order to shed more light on the relationship between the protection provided by a topical repellent against mosquito bites in laboratory and field settings, and to evaluate the efficacy of the active ingredient PMD against DEET under equal conditions, we conducted an experimental study that compares the protection times of 15% ethanolic solutions of PMD and DEET by exposing the same 18 study participants using similar parameters both in the field and in the laboratory.

Methods

Study design

This is a comparative study of laboratory and field methods to determine the efficacy of topical mosquito repellents. Two solutions of 15% DEET and 15% PMD were tested on human subjects as it utilised the repellent end-user in the testing process. The same volunteers tested the same formulations both under laboratory and field conditions. In order to generate comparable data the parameters in the field and in the laboratory experiments were kept as identical as possible, while following World Health Organization (WHO)²⁰ and the United States Environmental Protection Agency (US EPA)²¹ guidelines. The primary outcome was the complete protection time (CPT) and relative protection (%p) as compared to a negative control over 6 hours post application of the repellent.

Study participants

Eighteen study participants, 8 women and 10 men, showing low or no skin reactions against mosquito bites were recruited at the University of Basel and selected upon a face-to-face interview. The age of the study participants ranged between 21 and 37 years. The study was

approved by the Ethics Commission of Northwest and Central Switzerland (Study no: EKNZ 2015-238) and all study participants signed the informed consent form. To avoid unwanted bias the participants were asked to avoid alcohol and products such as perfume, eau de cologne and lotions for at least 12 hours before and during the experiments. During the experiments the participants were also asked to avoid rubbing, touching or wetting the repellent-treated area as well as any activity that might lead to increased perspiration.

Test formulations

The test formulations consisted of ethanolic solutions of 15% DEET (m/m) and 15% PMD (m/m) alongside a negative control of 70% ethanol (v/v). The test formulations were kindly provided by Vifor Consumer Health AG (Villars-sur-Glâne, Switzerland). DEET was chosen because it represents the gold standard and still remains the most effective mosquito repellent^{28,29}. PMD was chosen as this active ingredient has received less attention in the literature, is a natural based repellent and has been reported to be similarly effective as DEET^{18,19,30}.

Field experiments using the human landing catch method

In the field, the repellents were evaluated at two locations in Switzerland that differ in their ecology; the Langholz forest (E 7.87170, N 47.28607), a restored forest area in the Canton of Aargau and in the meadows of the Thuraue Nature Reserve (E 8.59496, N 47.59600) between the rivers Thur and Rhine in Ellikon am Rhein, Canton of Zürich. Both areas usually display a relatively high abundance of mosquitoes, while the Langholz forest also shows a very high mosquito species diversity³¹. The Thuraue are particularly known for the presence of the flood water mosquito *Aedes vexans*^{32,33}. During the study both areas were neither treated with insecticides nor were they subject to any other vector control measures.

The efficacy of the repellent formulations were first assessed in the Langholz forest between 20 July and 12 August 2015 and then in the Thuraue Nature Reserve between 17 and 30 August 2015. Using the human landing catch (HLC) method observations were made hourly for 30 minutes over 6 hours starting 1 hour post application of the formulations which took place at 17:00 hours and 14:15 hours in Langholz and Thuraue, respectively.

In the experiments, the 18 study participants were split into 3 groups of 6 (Supplementary Fig. 1). Each group tested the 2 formulations, 15% PMD and 15% DEET, and the negative control containing 70% ethanol. Over 3 consecutive days each person received each treatment once and 2 participants tested the same treatment on a given day. The sequence of treatment allocation was organised in a Williams balanced Latin Square design³⁴ to

minimise any bias due to first order carry-over effects, while on the first day each study participant was randomly assigned to one of the 6 possible schedules (Supplementary Fig. 1) by means of drawing lots. In addition, to avoid carry-over effects of residual repellents the other leg was treated on the subsequent day.

In preparation of the field experiments, the test surface (i.e. the bare lower leg) of the study participants were washed with neutral soap, rinsed, dried and swabbed with Arixtra wipes containing 70% isopropanol (Sanofi-Synthelabo, Meyrin, Switzerland). One of the lower legs was then treated with either one of the two repellent formulations or the negative control at a rate of 1 ml per 600 cm². The application volume was estimated on the basis of the surface area, calculated as the average of the circumferences just below the knee, the calf and the ankle, multiplied by the length of the lower leg, measured from below the knee to the ankle.

Sixty minutes after application of the treatment, the study participants were assigned to one of 6 positions that were set at least 20 m apart, as recommended in the WHO guidelines²⁰, in order to avoid bias due to competition in attractiveness to the mosquitoes. With the exception of the treated lower leg the whole body was fully protected from mosquito bites by a white jump suit, a bee keeper's hat and latex gloves through which mosquitoes could not bite. During an exposure period of 30 minutes the study participants sat on a stool and collected any mosquito alighting on the exposed lower leg using a mouth aspirator (Fig. 1). Collected insects were transferred to 50 ml Falcon tubes (Corning Life Sciences, Amsterdam, Netherlands) covered with mesh. When natural light conditions were insufficient to carry out collections the study participants used a head torch (7 LED, Cyba Headlight, Edelrid, Isny, Germany). Before the field experiments, the study participants were trained in collecting mosquitoes with a mouth aspirator in an experimental room containing free-flying mosquitoes.

An acoustic signal from a horn indicated the participants the start and the end of the 30 minutes exposure period. Following the exposure the study participants retreated from their position for 30 minutes before they moved to the next position, repeating the process above until they had 6 exposures over 6 hours. As with the treatment allocation, the sequence of rotation between the positions followed a Williams balanced Latin Square design and was randomly assigned to the study participants at the beginning of the sessions by drawing lots.

In addition to the mosquito collections by the study participants, mosquito traps were set in the study area to measure overall mosquito presence. The traps ran during the same 6 hours the study participants tested the repellents, yet the traps were set at least 20 metres away in order to avoid unwanted attraction of mosquitoes away from or towards to the study participants.

In the Langholz forest trapping was done with one BG-Sentinel trap baited with BG lure (Biogents AG, Regensburg, Germany) and one Centers for Disease Control (CDC) Miniature Light Trap (Model 512, John W. Hock Company, Gainesville, FL, USA) equipped with dry ice but with the light bulb removed. In the Thuraun Nature Reserve there was no access to dry ice and, therefore, the CDC light trap was replaced by a second BG-Sentinel trap baited with CO₂ from a bottle.



Figure 1. The HLC method for measuring the efficacy of topical repellents under field conditions. Mosquitoes alighting on the treated and exposed lower leg were aspirated by a mouth aspirator and kept in Falcon tubes for species identification in the laboratory. Apart from the treated area the whole body was fully protected by a jump suit, a bee keeper's hat and latex gloves through which mosquitoes cannot bite.

All collected mosquitoes were identified at the Swiss Tropical and Public Health Institute (Swiss TPH) with the aid of a stereo microscope using the identification keys of Francis Schaffner et al.³⁵ and Norbert Becker et al.³⁶. If it was not possible to identify a mosquito specimen on the basis of morphological characteristics, for example when it was damaged or a member of a species complex, the specimen was processed and sent to Mabritec AG (Riehen, Switzerland) for molecular identification. The molecular identification was based on matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), an emerging methodology for the identification of arthropods³⁷.

During the experiments, additional physical parameters were recorded, including wind speed, temperature and weather conditions. Experiments were only carried out as long as

the weather was dry. Average wind speeds recorded in both field trials were 0.25 m/s, ranging between 0 and 2.7 m/s, while the mean temperature was 24.8 °C, ranging from 17.9 °C to 33.5 °C.

Laboratory experiments using the arm-in-cage test

The laboratory experiments were conducted at Swiss TPH in Basel between 5 August and 21 November 2015, following the WHO guidelines for the arm-in-cage (AIC) test²⁰. In the AIC test, the protection time of a repellent is assessed by exposing a treated forearm to hungry mosquitoes at regular intervals. The cages measured 40 cm x 40 cm x 40 cm and were made of clear acrylic glass sides with an opening on the front side. At the bottom of the cage was a mirror positioned allowing for observation of mosquitoes landing on the lower side of the arm. The back side of the cage was made of a fine metal grid to ensure air supply during the experiments (Fig. 2).

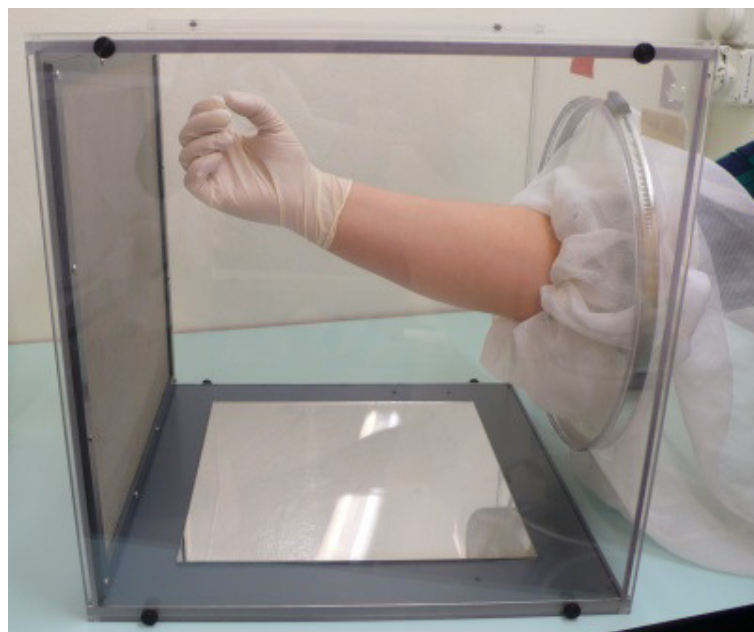


Figure 2. The arm-in-cage (AIC) test for measuring the efficacy of topical mosquito repellents under laboratory conditions. Hungry female mosquitoes are contained in a test cage and the repellent is applied to the forearm between the wrist and elbow, while the hand is protected by a latex glove through which the mosquitoes cannot bite.

The test cages contained 200 host seeking 5 to 10-day-old females of one of the 3 mosquito species; *Ae. aegypti*, *An. stephensi* or *Cx. quinquefasciatus*. The three mosquito species are WHO recommended model organisms²⁰. Adult mosquitoes were fed with 10% sucrose

solution and water *ad libitum*. Testing and rearing conditions for all mosquito colonies were maintained at 27 ± 2 °C and $60\%\pm 10\%$ relative humidity and a 12:12 (light:dark) photoperiod. Male and female mosquitoes were kept in the same rearing cages to allow mating to occur.

Experiments with *Ae. aegypti* were performed under artificial light at an intensity of 639 Lux, while tests with *An. stephensi* and *Cx. quinquefasciatus* were conducted under subdued light at an intensity of 49 Lux to mimic the conditions according to the mosquito species diurnal biting patterns. Twelve hours before the experiment, the sugar water was removed from the cage and the mosquitoes had only access to water.

Before exposure to the mosquitoes the forearm was washed with odourless soap, dried with a towel, swabbed with an Arixtra isopropanol wipe and then dried again. Then, to assess the readiness of the mosquitoes to land, the forearm of a study participant was exposed in the experimental cage for 60 seconds or until 10 landings were counted. A landing was defined as a mosquito alighting on the skin and remaining for at least 2 seconds. After measuring the landing activity with the untreated forearm the forearm was treated from wrist to elbow with either 15% PMD or 15% DEET at an application rate of 1 ml per 600 cm². In order to estimate the application volume the surface area of the forearm was calculated as the average circumference of the elbow, wrist and middle of the forearm multiplied by the distance between the wrist and the cubital joint. Each volunteer tested only one repellent per day. Thirty minutes after application of the repellent the participant exposed the treated forearm in the test cage for 3 minutes or until 10 mosquitoes landed. The procedure was then repeated every 30 minutes over 6 hours. The duration until the first, second and tenth landing of a mosquito on the treated forearm was noted. During the exposure time volunteers were allowed to shake off the mosquitoes before they started biting, preventing an excessive number of bites. At the end of the experiment the arm was again washed and dried as before, and a second control measurement of the mosquitoes' landing activity was taken.

Data analysis

Raw data recorded on paper forms were entered into a Microsoft Excel 2010 spread sheet. Each entry was double-checked by two different persons and the records were inspected for outliers and inconsistencies. Statistical analysis was performed in the open source package R version 3.4.2³⁸ and graphs were produced with the R package "ggplot2"³⁹.

The endpoint measured in the experiments was the number of mosquitoes landing on the bare skin during each exposure period. Based on the number of landings and exposure times two outcome measures were estimated following the WHO guidelines²⁰: the complete

protection time (CPT) and the percentage protection (%*p*) over time.

CPT is defined as the time elapsed between the application of the repellent and the first mosquito landing. Average CPTs (median and 95% confidence interval; 95% CI) over all study participants were estimated based on a Kaplan-Meier survival analysis implemented in the R package “survival”^{40,41} and compared between the two repellent formulations using the Mantel-Haenszel test, including a stratification term for study participants.

%*p* was calculated as the reduction in landings by the treatment when compared to the negative control over all exposures using equation (1).

$$\%p = \frac{C-T}{C} \times 100 \quad (1)$$

Where *T* is the average number of mosquitoes landing on the surface per second in a test and *C* is the average number of mosquitoes per second landing on the skin surface treated with the negative control in the field experiment or the untreated forearm in the AIC test.

Landing rates were estimated on the basis of generalised linear models (GLM) with a negative binomial distribution and a log link function. Separate GLMs were modelled for the field and laboratory experiments. For the field data landing rates were modelled as a function of treatment, time post application and location. In addition, interaction terms were introduced into the model to account for non-additive effects between treatment, time and location. Similar to the field experiments, landing rates in the AIC test were modelled as a function of treatment, time post application and mosquito strain, and interaction terms were introduced to account for non-additive effects. In both models an offset term with the log of the exposure time was introduced capturing the differences in exposure times between tests (e.g. the study participants were allowed to conclude an exposure after 10 landings in the AIC test).

As for the landing rates average %*p* over the 6 hours test period was estimated using GLMs to model the total number of landings per person per second and then compared between 15% PMD and 15% DEET. The same approach was also used to compare the control landing rates in the AIC tests before and after the experiments.

For statistical testing the level of significance was set at $\alpha = 0.05$.

Results

From the 18 study participants initially enrolled, one female dropped out during the study; hence only 17 participants were included in the data analysis. In addition, for the field experiments in the Thuraueu Nature Reserve, one measurement is missing for 15% PMD and

one for the negative control due to two study participants being on sick leave.

Mosquito species composition in the field

In total, 227 landings were recorded in the field experiments using HLC with an approximately equal number of mosquitoes counted in the Langholz forest ($n = 115$) and the Thuraen Nature Reserve ($n = 112$). From the 227 recorded landings, 118 mosquitoes were actually collected in tubes and subjected to a taxonomical identification (Table 1). Only 1 out of the 118 mosquitoes could not be identified neither to species nor genus level. In addition to the HLC, mosquitoes were also trapped by BG-Sentinel traps and a CDC miniature light trap in the Langholz forest (Table 1) that ran in parallel during the experiments. In the BG-Sentinel traps 59 and 8 specimens were collected in the Thuraen Nature Reserve and the Langholz forest, respectively, while the CDC light trap caught 272 specimens. Again, most of the specimens could be identified to either species or at least to genus level (i.e. 1.8%, $n = 339$).

Table 1. Species composition of mosquitoes collected over the course of the field experiments by HLC, BG-Sentinel trap and the CDC miniature light trap.

Species	HLC			BG-Sentinel trap			CDC light trap
	Langholz	Thuraen	Total	Langholz	Thuraen	Total	Langholz
<i>Aedes annulipes</i>	0	1 (1.8)	1 (0.8)	0	0	0	0
<i>Aedes cinereus/geminus</i> ¹	32 (52.5)	13 (22.8)	45 (38.1)	0	21 (35.6)	21 (31.3)	14 (1.1)
<i>Aedes vexans</i>	4 (6.6)	37 (64.9)	41 (34.7)	0	21 (35.6)	21 (31.3)	0
<i>Aedes sticticus</i>	7 (11.5)	0	7 (5.9)	2 (25.0)	0	2 (3.0)	3 (1.1)
<i>Anopheles claviger</i>	0	0	0	0	1 (1.7)	1 (1.5)	0
<i>Anopheles maculipennis</i>	1 (1.6)	0	1 (0.8)	0	0	0	115 (42.3)
<i>Anopheles plumbeus</i>	9 (14.8)	3 (5.3)	12 (10.2)	1 (12.5)	0	1 (1.5)	27 (9.9)
<i>Anopheles</i> sp.	0	0	0	0	0	0	1 (0.4)
<i>Coquillettidia richiardii</i>	6 (9.8)	1 (1.8)	7 (5.9)	0	1 (1.7)	1 (1.5)	19 (7.0)
<i>Culex martinii</i>	2 (3.3)	0	2 (1.7)	0	3 (5.1)	3 (4.5)	2 (0.7)
<i>Culex pipiens</i>	0	2 (3.5)	2 (1.7)	5 (62.5)	11 (18.6)	16 (23.9)	82 (30.1)
<i>Culiseta galphroptera</i>	0	0	0	0	0	0	4 (1.5)
Not identified	0	0	0	0	1 (1.7)	1 (1.5)	5 (1.8)
Total	61	57	118	8	59	67	272

The figures show the number of specimens collected and percentage composition (%). ¹The sibling species could not be distinguished and were counted as one single taxon.

The predominant taxa were *Ae. cinereus/geminus*, a species complex, and *Ae. vexans*, followed by *An. plumbeus*. *Ae. cinereus/geminus* was the most common taxon in the Langholz forest and *Ae. vexans* was the most common species in the Thuraen Nature Reserve. Together, the two taxa make 70.5% of the overall species identified in the HLC. In terms of biting activity, *Ae. vexans* was predominantly active in the late afternoon, while *Ae. cinereus/geminus* was mainly active around and after sun set. In contrast, the identified *An. plumbeus* specimens were mainly active during the crepuscular period.

Human landing rates

Human landing rates differed considerably between the laboratory and the field experiments, both on the treated and untreated surfaces. In the negative control, the average number of landings per second (mean and range) was 0.00046 (0.0 – 0.0072) in the Langholz forest and 0.00057 (0.0 – 0.0056) in the Thuraen Nature Reserve (Fig. 3A). In contrast, in the AIC tests the average number of landings per second were several magnitudes higher; 1.68 (0.07 – 10.0), 0.54 (0.05 – 1.67) and 0.31 (0.2 – 1.0) landings per second for *Ae. aegypti*, *An. stephensi* and *Cx. quinquefasciatus*, respectively (Fig. 3B). The landing rates in the negative controls in the field experiments showed an increase towards the end of the 6 hours test period, suggesting mosquitoes becoming more active towards the end of the day (Fig. 3A). In the AIC the negative controls performed before and after the actual experiment also showed differences in landing activities. In *Ae. aegypti* (rate ratio between prior and post experiment; $RR_{\text{prior-post}} = 1.44$, $p < 0.001$) and *An. stephensi* ($RR_{\text{prior-post}} = 1.36$; $p < 0.01$) the mosquitoes were less active at the end of the test, while in *Cx. quinquefasciatus* ($RR_{\text{prior-post}} = 0.61$; $p < 0.001$) the mosquitoes showed the opposite behaviour (Fig. 3B).

In the field, the landing rates for all conditions increased over time but were lower in the 15% PMD and 15% DEET arms, while there was statistically no significant difference between the landing rates of PMD and DEET (Fig. 3A and Table 2). Across the three different lab colonies tested in the AIC, there was no consistent difference in PMD and DEET (Fig. 3A and Table 3), yet DEET outperformed PMD against *An. stephensi* ($RR_{\text{PMD-DEET}} = 7.55$; $p < 0.001$) and to a lesser extent also against *Cx. quinquefasciatus* ($RR_{\text{PMD-DEET}} = 4.14$; $p < 0.001$) although towards the end of the 6 hours exposure period PMD was catching up with DEET. For *Ae. aegypti* the difference between PMD and DEED was statistically not significant ($RR_{\text{PMD-DEET}} = 0.82$; $p = 0.358$).

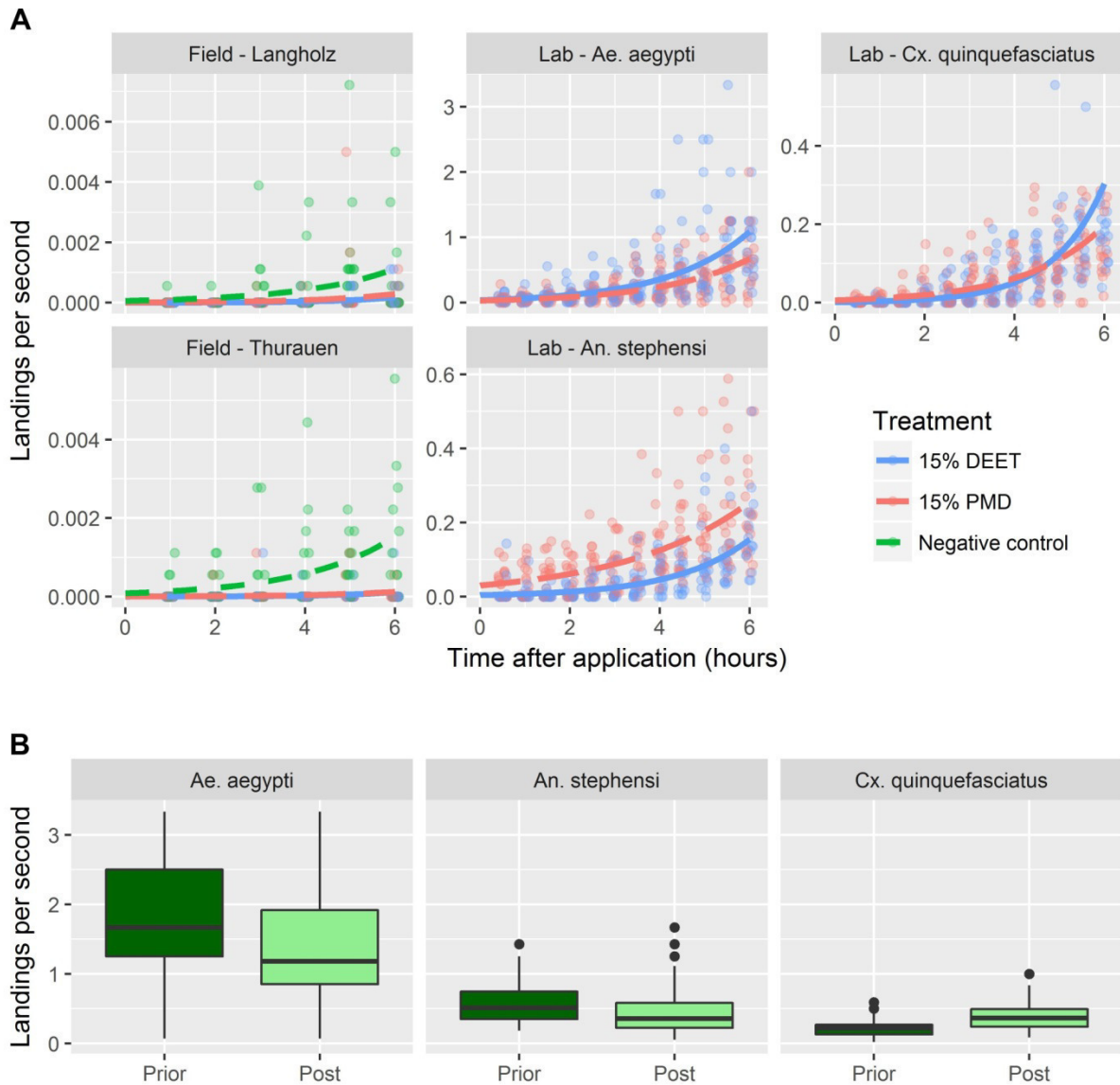


Figure 3. Landing rates in the laboratory and field experiments. **(A)** Landing rates as a function of time. While in the field experiments the participants tested a negative control over 6 hours, the negative control in the laboratory AIC test was done once before and once after the actual experiment with the treated arm; hence no curve is plotted for the negative control for the AIC tests as for the field experiments. For ease of visibility the points are jittered along the x-axis. The individual model parameters of the underlying GLMs are given in Table 2 and 3. **(B)** Landing rates measured in the AIC test on the untreated forearms prior and post treatment with the repellent. The boxes represent the interquartile distances (IQD), while the centrelines through each box show the medians. The dots indicate outliers and the whiskers extend to the extreme values of the data, calculated as $\pm 1.5 \times \text{IQD}$ from the median. For ease of readability a single outlier showing a landing rate of 10 landings per second in *Ae. aegypti* in the first control has been removed from the graphic.

While in the laboratory tests landing rates in the controls were almost similar before and after the experiments, the landing rates in the controls of the field experiments increased considerably towards the end of the 6 hours test period (Fig. 3).

Table 2. Generalised linear model to estimate and predict the average mosquito landing rates in the field experiments

Parameter	β (\log_2)	SE (β) (\log_2)	Z-value	P-value
(Intercept)	-9.378	0.416	-22.542	< 0.001
Location (Langholz)	-0.310	0.299	-1.037	0.3
Treatment (15% DEET)	-4.035	1.306	-3.090	< 0.01
Treatment (15% PMD)	-3.133	1.024	-3.061	< 0.01
Time (post application)	0.483	0.092	5.254	< 0.001
Interaction term: Location (Langholz) x treatment (15% DEET)	0.779	0.667	1.167	0.243
Interaction term: Location (Langholz) x treatment (15% PMD)	1.159	0.606	1.914	0.056
Interaction term: Treatment (15% DEET) x time	0.235	0.250	0.941	0.347
Interaction term: Treatment (15% PMD) x time	0.101	0.199	0.506	0.613

β : regression coefficient; SE(β): standard error of β . The intercept corresponds to the reference that is the number of landings per second in the negative control in the Thuraen Nature Reserve.

Table 3 Generalised linear model to estimate and predict the average mosquito landing rates in the arm-in-cage experiments

Parameter	β (\log_2)	SE(β) (\log_2)	Z-value	P-value
(Intercept)	-3.239	0.150	-21.627	< 0.001
Treatment (15% PMD)	-0.195	0.213	-0.919	0.358
Lab colony (<i>An. stephensi</i>)	-2.288	0.235	-9.735	< 0.001
Lab colony (<i>Cx. quinquefasciatus</i>)	-3.253	0.253	-12.871	< 0.001
Time (post application)	0.554	0.041	13.671	< 0.001
Interaction term: Treatment (15% PMD) x lab colony (<i>An. stephensi</i>)	2.217	0.318	6.977	< 0.001
Interaction term: Treatment (15% PMD) x lab colony (<i>Cx. quinquefasciatus</i>)	1.615	0.340	4.755	< 0.001
Interaction term: Treatment (15% PMD) x time (post application)	-0.048	0.057	-0.832	0.405
Interaction term: Lab colony (<i>An. stephensi</i>) x time (post application)	0.056	0.061	0.914	0.361
Interaction term: Lab colony (<i>Cx. quinquefasciatus</i>) x time (post application)	0.329	0.064	5.121	< 0.001
Interaction term: Treatment (15% PMD) x lab colony (<i>An. stephensi</i>) x time (post application)	-0.206	0.084	-2.441	0.015
Interaction term: Treatment (15% PMD) x lab colony (<i>Cx. quinquefasciatus</i>) x time (post application)	-0.261	0.088	-2.961	< 0.01

β : regression coefficient; SE(β): standard error of β . The intercept corresponds to the reference that is the number of landings per second in the DEET treatment in *Aedes aegypti*.

Complete protection time

CPT corresponds to the time from the application of the formulation until failure of the repellent, measured here as the first mosquito landing on the treated area. CPTs were much higher in the field experiments and are in agreement with the low landing rates observed both in the Langholz forest and the Thurauen Nature Reserve. In fact, more than 50% of the participants had not received a single landing even at 6 hours post application of the repellent formulations (Fig. 3; Supplementary Fig. S2). Despite the low numbers of landings,

even recorded in the negative control, the time to the first landing was much longer in the treatment arms as compared to the negative control arm (Control Langholz: 4 hours, $\chi^2 = 17.6$, $df = 2$, $p < 0.001$; control Thuraen: 3 hours, $\chi^2 = 23.2$, $df = 2$, $p < 0.0001$).

The picture for the CPTs in the AIC test is quite different but reflects the observations made for the landing rates. Here, CPTs for DEET were 30 minutes against *Ae. aegypti*, 2 hours against *An. stephensi* (95% CI: 1 – 3 hours) and 2 hours (95% CI: 1.5 – 3.5 hours) against *Cx. quinquefasciatus*. The median CPTs for PMD were lower than for DEET against *An. stephensi* and *Cx. quinquefasciatus* with 0.5 hour (95% CI: 0.5 – 1.0 hour; $\chi^2 = 0.3$, $p < 0.05$) and 1 hour (95% CI: 0.5 – 1 hour; $\chi^2 = 5.0$, $p = 0.052$), respectively, while the median CPT for *Ae. aegypti* was as for PMD a maximum of 0.5 hour. In summary, the CPTs very much reflect the observations made from the landing rates (Figure 2 and 3).

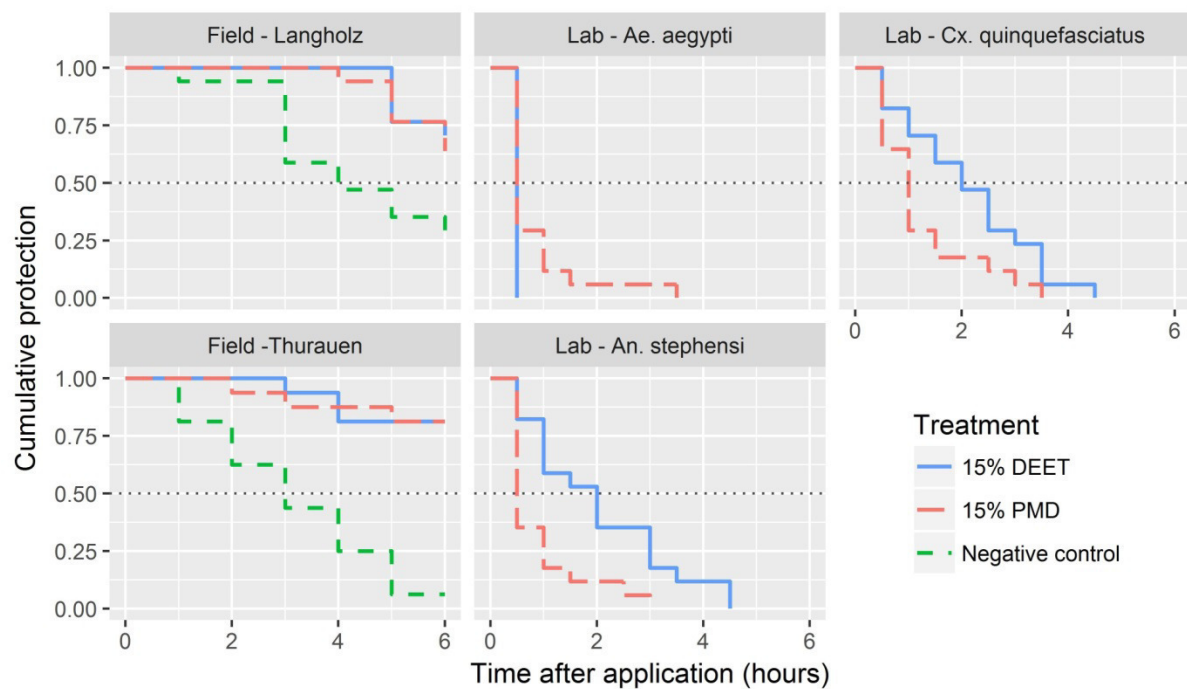


Figure 6. Cumulative complete protection time (CPT). The lines show the proportion of study participants remaining completely protected by the applied formulation as a function of time post application. While in the field experiments the participants tested a negative control over 6 hours, the negative control in the AIC test was only done before and after the experiment; hence no curve is plotted for the negative control for the AIC tests. The intersections between the survival curves and the dotted lines, representing 50% cumulative protection, indicate the median CPTs.

The observation that both repellent formulations showed a much longer complete protection under field conditions may be explained by the fact that landing rates measured in the field were magnitudes lower than in the AIC test (Fig. 3).

Relative protection over time

In agreement with CPT, %*p* over the 6 hours period reveals a similar picture in that the relative protection was similar between 15% PMD and 15% DEET with the only exception of the laboratory experiment in *An. stephensi* where PMD provided less protection than DEET ($RR_{\text{DEET-PMD}} = 1.15$; $p < 0.001$; Fig. 7). Intriguingly, when comparing the relative protection between the laboratory and field experiments average protection was fairly similar although the results from the field showed somewhat higher variability, particularly in the experiments in the Thuraen Nature Reserve, reflected by larger 95% CIs.

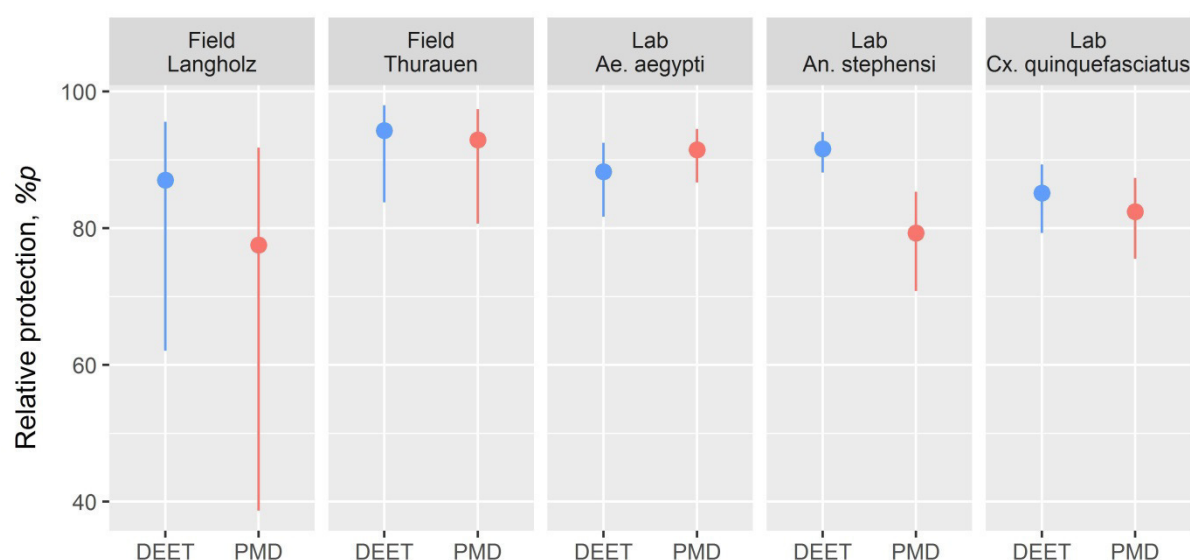


Figure 7. Relative protection (%*p*) over 6 hours for 15% PMD and 15% DEET. %*p* was calculated using Equation (1) on the bases of landing rates estimated by individual GLMs for each experiment. The points show the average %*p*, while the lines indicate the 95% CI's of the point estimates.

Discussion

The results from the comparative study between the AIC test and the HLC method in the field revealed comparable efficacy for 15% PMD and 15% DEET with the exception of DEET being superior to PMD against *An. stephensi* in the AIC test. The median CPTs in the AIC

tests ranged between 0.5 and 1 hours for 15% PMD and between 0.5 and 2 hour for 15% DEET, while the CPTs measured in the field were at least 6 hours for both 15% DEET and 15% PMD. In contrast to the CPTs, %p did not vary greatly between the laboratory and field experiments. Intriguingly, irrespective of whether the repellent efficacy was measured by CPT or %p the relative outcome between 15% PMD and 15% DEET remained the same.

Several previous studies have compared the efficacy of PMD against DEET in biting mosquitoes using human subjects, both in the laboratory and in the field, and found that PMD shows comparable efficacy to DEET^{13,16,18,22,30,42}. A caveat of those studies is, however, that the formulations were all commercially available products, also containing additional compounds that may influence the efficacy outcome in one or the other way. It is also noteworthy that in most studies the amount contained in the formulations differed between the PMD and DEET products, making a side-by-side comparison even more complex. The present study took these weaknesses of the earlier studies into consideration and compared two formulations that differed only in the active ingredient itself. That is both formulations evaluated consisted of ethanolic solutions at the same concentration of either PMD or DEET; hence the present study provides important information to the debate of alternative repellents to DEET and confirms that PMD provides a high level of protection which is almost as good as for DEET.

In the present study, the CPTs were clearly associated with the intensity of landing rates. In the laboratory, where the landing rates were magnitudes higher than in the field, the CPTs were also much shorter. A similar relationship is also seen when inspecting the landing rates across the AIC tests in that the shortest CPTs against DEET as well as against PMD were observed in *Ae. aegypti*, the mosquito species also showing the highest landing rates. A similar observation has previous been made by Barnard et al.⁴³ who found for *Ae. aegypti* and *An. quadriannulatus* that the mean duration of protection from mosquito bites is linked to the initial biting rates in the controls.

The relationship between landing pressure and CPT is of some concern in the present study because the landing rates observed during the field tests were rather low as compared to previous field efficacy trials. For example, Carroll and Loye²² recorded from their field trial in California biting rates of 1.5 bites per minute on the untreated arm and 3 bites per minute on the untreated leg. In their field trial in northern Thailand, Champakaew et al.⁴⁴ recorded a mean collecting rate of 2-204.2 mosquitoes per 20 minutes. While the WHO guidelines do not state the minimum landing pressure required to initiate or continue a repellent test, the EPA guidelines are stricter on that subject and recommend a minimum of one mosquito landing within one minute. Granett⁴⁵ even suggested a minimum biting rate requirement of one bite within 3 seconds on an exposed arm, irrespective of whether the experiments are

carried out in the laboratory or in the field. According to the above references, the landing pressures measured in the current study would be too low. Unfortunately, the summer 2015 was exceptionally dry⁴⁶, explaining to some extent the relatively low numbers of mosquitoes caught by the HLC. However, the observed landing rates observed here are on par with published data from southern England⁴⁷ where average landing rates across different sites ranged between 0.00014 and 0.0028 landings per second, suggesting that such low landing rates might not be uncommon in the European context and simply represent the ecological reality of mosquito biology in Switzerland.

Mosquito landing rates may be influenced by various factors, including mosquito species³⁶, diurnal activity patterns and mosquito density. Due to the relatively low numbers the data from the present study do not allow for measuring and comparing landing activity between species but the mosquito species most frequently caught were *Ae. vexans* and *Ae. cinereus/geminus*. *Ae. vexans*, a highly anthropophilic mosquito species³³ was more prominent in the Thuraue Nature Reserve, while *Ae. cinereus/geminus* was predominant in the Langholz forest. This observation matches with the habitat preference and biting behaviour described for these species. *Ae. vexans* predominantly breeds in high numbers in temporarily inundated areas such as meadows as are present in the Thuraue Nature Reserve and is known to have a large flight range up to several kilometres³⁶. In contrast, the sibling species *Ae. cinereus* and *Ae. geminus* prefer the edges of semi-permanent, partly shaded pools³⁶. *Ae. vexans* is an important nuisance mosquito and could potentially act as a bridge vector for West-Nile virus³³ as it also bites birds and has been shown to be a competent vector under laboratory conditions^{48,49}. The vector potential of *Ae. cinereus/geminus* is less known.

In addition to the landing rates, efficacy of a repellent also depends on the sensitivity of the test species. For example, Roey et al. found that the efficacy of picaridin repellents differed among Southeast Asian vectors of malaria and arboviruses⁵⁰. Importantly, a key difference between the present field and laboratory tests was the presence of mosquito test species. While the mosquitoes in the field are indigenous to Switzerland, the test species in the laboratory AIC were three highly anthropophilic mosquito species from the tropics that are recommended by WHO for testing topical repellents²⁰. *Ae. aegypti* is a very aggressive, anthropophilic mosquito species that shows low sensitivity to repellents⁵¹, while *Cx. quinquefasciatus* is generally less active in the AIC test.

As field tests are time and cost intensive there is a lot of debate as to what extent field studies might be replaced by AIC tests. In general, biting rates in the AIC tests were extremely high compared to the biting rates encountered in the HLC, suggesting that the laboratory assays rather simulate extreme conditions. Therefore, the AIC test may be seen

as a very conservative test. Most likely repellents showing protection under the harsh AIC setting might actually reduce biting even better under field conditions, at least as long as the solution is not mechanically rubbed or washed off through. At first glance the results would suggest that the AIC might only have to be calibrated against the landing rates observed in the field. However, as mosquitoes show differential sensitivity to repellents this might be a rather naïve assumption. Therefore, it would be desirable to study the relationship between landing rates and repellent efficacy in more depth before modifying the AIC test in an attempt to adapt it more closely to the situation in the field.

Conclusions

DEET slightly outperforms PMD under laboratory conditions, while PMD and DEET show similar efficacy over 6 hours against outdoor biting mosquitoes in Switzerland, irrespective of the ecological setting. Both CPT and landing rates over time provide a similar picture with reference to comparative protection efficacy between PMD and DEET, while CPT is linked to the observed landing rates. As the AIC set-up with the more anthropophilic mosquito species and high numbers yields very high landing rates, the AIC test in its current form may underestimate the actual efficacy of a topical mosquito repellent in areas with low to moderate mosquito landing pressure.

References

- 1 Tomasello, D. & Schlagenhauf, P. Chikungunya and dengue autochthonous cases in Europe, 2007-2012. *Travel Med Infect Dis* **11**, 274-284, doi:10.1016/j.tmaid.2013.07.006 (2013).
- 2 La Ruche, G. *et al.* First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* **15**, 19676 (2010).
- 3 Venturi, G. *et al.* Detection of a chikungunya outbreak in Central Italy, August to September 2017. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* **22**, doi:10.2807/1560-7917.ES.2017.22.39.17-00646 (2017).
- 4 Gjenero-Morgan, I. A. B., Krajcar D., Lesnikar, V., Klobucar, A., Prem-Novosel, I. *et al.* . Autochthonous dengue fever in Croatia, August-September 2010. (2011).
- 5 Moore, S. J., Mordue Luntz, A. J. & Logan, J. G. Insect bite prevention. *Infect Dis Clin North Am* **26**, 655-673, doi:10.1016/j.idc.2012.07.002 (2012).
- 6 Debboun, M., Strickman D.A. and Klun, J.A. (MDtravelhealth.com, 2005).

- 7 Goodyer, L. I. *et al.* Expert Review of the Evidence Base for Arthropod Bite Avoidance. *Journal of Travel Medicine* **17**, 182-192, doi:DOI 10.1111/j.1708-8305.2010.00402.x (2010).
- 8 Dickens, J. C. & Bohbot, J. D. Mini review: Mode of action of mosquito repellents. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **106**, 149-155, doi:DOI 10.1016/j.pestbp.2013.02.006 (2013).
- 9 Katz, T. M., Miller, J. H., Hebert, A.A. Insect repellents: Historical perspectives and new developments. *Journal of the American Academy of Dermatology* **58**, 865-871, doi:DOI 10.1016/j.jaad.2007.10.005 (2008).
- 10 Roberts, J. R. & Reigart, J. R. Does anything beat DEET? *Pediatr Ann* **33**, 443-453 (2004).
- 11 Sudakin, D. L., and Trevathan, W.R. DEET: A Review and Update of Safety and Risk in the General Population. *Journal of Toxicology* **41**, 831-839 (2003).
- 12 Chen-Hussey, V., Behrens, R. & Logan, J. G. Assessment of methods used to determine the safety of the topical insect repellent N,N-diethyl-m-toluamide (DEET). *Parasit Vectors* **7**, 173, doi:10.1186/1756-3305-7-173 (2014).
- 13 Trigg, J. K. Evaluation of a eucalyptus-based repellent against *Anopheles* spp. in Tanzania. *J Am Mosq Control Assoc* **12**, 243-246 (1996).
- 14 Carroll, S. P. & Loye, J. PMD, a registered botanical mosquito repellent with deet-like efficacy. *Journal of the American Mosquito Control Association* **22**, 507-514 (2006).
- 15 Barnard, D. R. & Xue, R. D. Laboratory evaluation of mosquito repellents against *Aedes albopictus*, *Culex nigripalpus*, and *Ochlerotatus triseriatus* (Diptera: Culicidae). *J.Med.Entomol.* **41**, 726-730 (2004).
- 16 Trigg, J. K., Hill, N. Laboratory Evaluation of a Eucalyptus-based Repellent against Four Biting Arthropods. *Phytotherapy Research* **10** (1996).
- 17 Moore, S. J., Lenglet, A. & Hill, N. Field evaluation of three plant-based insect repellents against malaria vectors in Vaca Diez province, the Bolivian Amazon. *Journal of the American Mosquito Control Association* **18**, 107-110 (2002).
- 18 Govere, J., Durrheim, D. N., Baker, L., Hunt, R. & Coetzee, M. Efficacy of three insect repellents against the malaria vector *Anopheles arabiensis*. *Medical and Veterinary Entomology* **14**, 441-444, doi:DOI 10.1046/j.1365-2915.2000.00261.x (2000).
- 19 Barnard, D. R., Bernier, U. R., Posey, K. H. & Xue, R. D. Repellency of IR3535, KBR3023, para-menthane-3,8-diol, and deet to black salt marsh mosquitoes (Diptera : Culicidae) in the Everglades National Park. *Journal of Medical Entomology* **39**, 895-899, doi:Doi 10.1603/0022-2585-39.6.895 (2002).

- 20 WHO. Guidelines for Efficacy Testing of Mosquito Repellents for Human Skin. (Geneva: World health Organization, 2009).
- 21 EPA. Product Performance Test Guidelines. (United States Environmental Protection Agency, 2010).
- 22 Carroll, S. P. & Loye, J. PMD, a registered botanical mosquito repellent with deet-like efficacy. *J.Am.Mosq.Control Assoc.* **22**, 507-514 (2006).
- 23 Rodriguez, S. D., Drake, L. L., Price, D. P., Hammond, J. I. & Hansen, I. A. The Efficacy of Some Commercially Available Insect Repellents for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J Insect Sci* **15**, 140, doi:10.1093/jisesa/iev125 (2015).
- 24 Drapeau, J. *et al.* Effective Insect Repellent Formulation in both Surfactantless and Classical Microemulsions with a Long-Lasting Protection for Human Beings. *Chem Biodivers* **6**, 934-947 (2009).
- 25 Barasa, S. S., Ndiege, I. O., Lwande, W. & Hassanali, A. Repellent activities of stereoisomers of p-menthane-3,8-diols against *Anopheles gambiae* (Diptera : Culicidae). *Journal of Medical Entomology* **39**, 736-741, doi:Doi 10.1603/0022-2585-39.5.736 (2002).
- 26 Moore, S. J., Darling, S. T., Sihuincha, M., Padilla, N. & Devine, G. J. A low-cost repellent for malaria vectors in the Americas: results of two field trials in Guatemala and Peru. *Malar J* **6**, 101, doi:10.1186/1475-2875-6-101 (2007).
- 27 Barnard, D. R., Bernier, U. R., Posey, K. H. & Xue, R. D. Repellency of IR3535, KBR3023, para-menthane-3,8-diol, and deet to black salt marsh mosquitoes (Diptera: Culicidae) in the Everglades National Park. *J Med Entomol* **39**, 895-899 (2002).
- 28 Koren, G., Matsui, D. and Bailey, B. DEET-based insect repellents: safety implications for children and pregnant and lactating women. *Can Med Assoc J* **169** (3) (2003).
- 29 Sudakin, D. L., Trevathan, W. R. DEET: A Review and Update of Safety and Risk in the General Population. *Journal of Toxicology* **41**, 831-839 (2003).
- 30 Uzzan, B. *et al.* Efficacy of four insect repellents against mosquito bites: a double-blind randomized placebo-controlled field study in Senegal. *Fund Clin Pharmacol* **23**, 589-594, doi:DOI 10.1111/j.1472-8206.2009.00731.x (2009).
- 31 Colucci, B., Vavassori, L., Suter, T. and Müller, P. Vorkommen von Stechmücken im Naturwaldreservat Langholz, Kanton Aargau. (2014).
- 32 Briegel, H., Waltert, A. & Kuhn, A. R. Reproductive physiology of *Aedes* (*Aedimorphus*) *vexans* (Diptera: Culicidae) in relation to flight potential. *J Med Entomol* **38**, 557-565 (2001).

- 33 Schonenberger, A. C. *et al.* Host preferences in host-seeking and blood-fed mosquitoes in Switzerland. *Med Vet Entomol* **30**, 39-52, doi:10.1111/mve.12155 (2016).
- 34 E., W. Experimental Designs Balanced for the Estimation of Residual Effects of Treatments. *Aust J Chem*, 149–168 (1949).
- 35 Schaffner F., A. G., Geoffroy B., Hervy J.-P., Rhaïem A., Brunhes J. . (2001).
- 36 Becker N., P. D., Zgomba M., Boase C., Madon M., Dahl C., Kaiser A. *Mosquitoes and Their Control*. Second Edition edn, (Springer Verlag, 2010).
- 37 Yssouf, A., Almeras, L., Raoult, D. & Parola, P. Emerging tools for identification of arthropod vectors. *Future Microbiol* **11**, 549-566, doi:10.2217/fmb.16.5 (2016).
- 38 R: A language and environment for statistical computing. (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2017).
- 39 Wickham, H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. 2 edn, (New York: Springer Nature, 2016).
- 40 Harrington, D. P. & Fleming, T. R. A Class of Rank Test Procedures for Censored Survival-Data. *Biometrika* **69**, 553-566, doi:DOI 10.1093/biomet/69.3.553 (1982).
- 41 Grambsch, T. M. T. a. P. M. *Modeling Survival Data: Extending the Cox Model*. (Springer, New York, 2000).
- 42 Barnard, D. R. & Xue, R. D. Laboratory evaluation of mosquito repellents against *Aedes albopictus*, *Culex nigripalpus*, and *Ochlerotatus triseriatus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* **41**, 726-730 (2004).
- 43 Barnard, D. R., Posey, K. H., Smith, D. & Schreck, C. E. Mosquito density, biting rate and cage size effects on repellent tests. *Medical and Veterinary Entomology* **12**, 39-45, doi:DOI 10.1046/j.1365-2915.1998.00078.x (1998).
- 44 Champakaew, D. *et al.* Assessment of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels as a repellent for personal protection against mosquitoes under laboratory and field conditions in northern Thailand. *Parasit Vectors* **9**, 373, doi:10.1186/s13071-016-1650-y (2016).
- 45 Granett, P. The development of a practical mosquito repellent. *Proceedings of the New Jersey Mosquito Extermination Association* **27**, 36-43 (1944).
- 46 MeteoSchweiz. Klimabulletin Jahr 2015. (Zürich, 2016).
- 47 Brugman, V. A. *et al.* How often do mosquitoes bite humans in southern England? A standardised summer trial at four sites reveals spatial, temporal and site-related variation in biting rates. *Parasit Vectors* **10**, 420, doi:10.1186/s13071-017-2360-9 (2017).
- 48 Turell, M. J. *et al.* An update on the potential of north American mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit West Nile Virus. *J Med Entomol* **42**, 57-62 (2005).

- 49 Tiawsirisup, S. *et al.* Vector competence of *Aedes vexans* (Diptera : Culicidae) for West Nile virus and potential as an enzootic vector. *Journal of Medical Entomology* **45**, 452-457, doi:Doi 10.1603/0022-2585(2008)45[452:Vcoavd]2.0.Co;2 (2008).
- 50 Van Roey, K. *et al.* Field Evaluation of Picaridin Repellents Reveals Differences in Repellent Sensitivity between Southeast Asian Vectors of Malaria and Arboviruses. *Plos Neglect Trop D* **8**, doi:ARTN e3326 10.1371/journal.pntd.0003326 (2014).
- 51 Rutledge, L. C., Collister, D. M., Meixsell, V. E. & Eisenberg, G. H. Comparative sensitivity of representative mosquitoes (Diptera: Culicidae) to repellents. *J Med Entomol* **20**, 506-510 (1983).

Acknowledgements

We would like to thank Stefanie Strauch from the Swiss Federal Office of Public Health for her support and fruitful discussions. A special thank goes to Mervi Laitinen for her technical support in implementing the field trials and her help with the identification of the collected mosquito specimens. We thank Dr Burkhard Kriwet from Vifor Consumer Health SA for preparing the repellent formulations used in the study. We would also like to acknowledge Marcel Murri from the Abteilung Wald, Canton of Aargau and Corina Schiess from the Fachstelle Naturschutz, Canton of Zürich for granting permissions to carry out the field trials in the Langholz forest and the Thuraue Nature Reserves. We would also like to acknowledge the kind assistance of the rangers of the Thuraue Nature Reserve and our taxi driver, Peter Hinnen, Dr Gabi Müller and Prof em Dr Peter Lüthy for their assistance. We thank Drs Sarah Moore and Amanda Ross for helpful discussions on the study design and the Swiss TPH Study Secretariat for their support in submitting the study protocol to the ethical committee. Last but not least we are very grateful to the volunteers for their great collaboration in the field and laboratory experiments.

This work received funding from the Swiss Federal Office of Public Health (Order no. 13.000707).

Authors' contributions

BC conducted the field and laboratory experiments. BC and PM designed the study, analysed the field and laboratory data and wrote the manuscript. Both authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

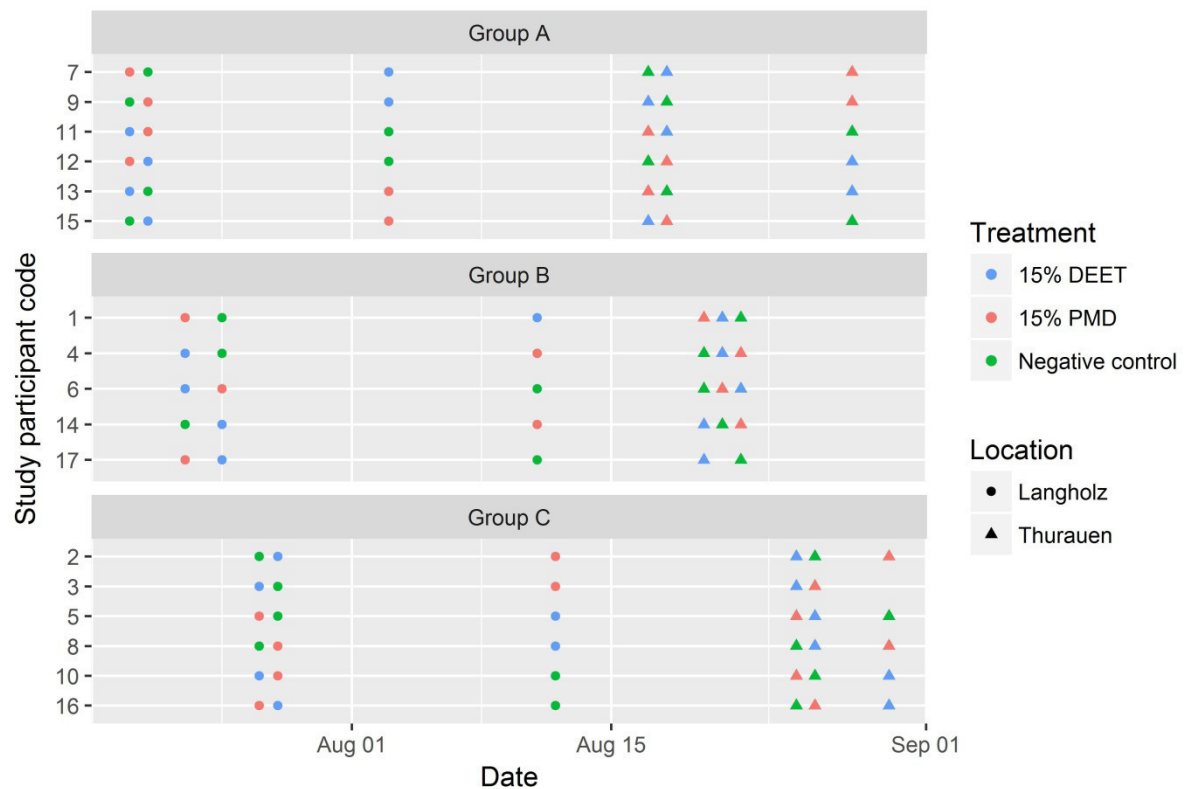
Data availability statement

The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

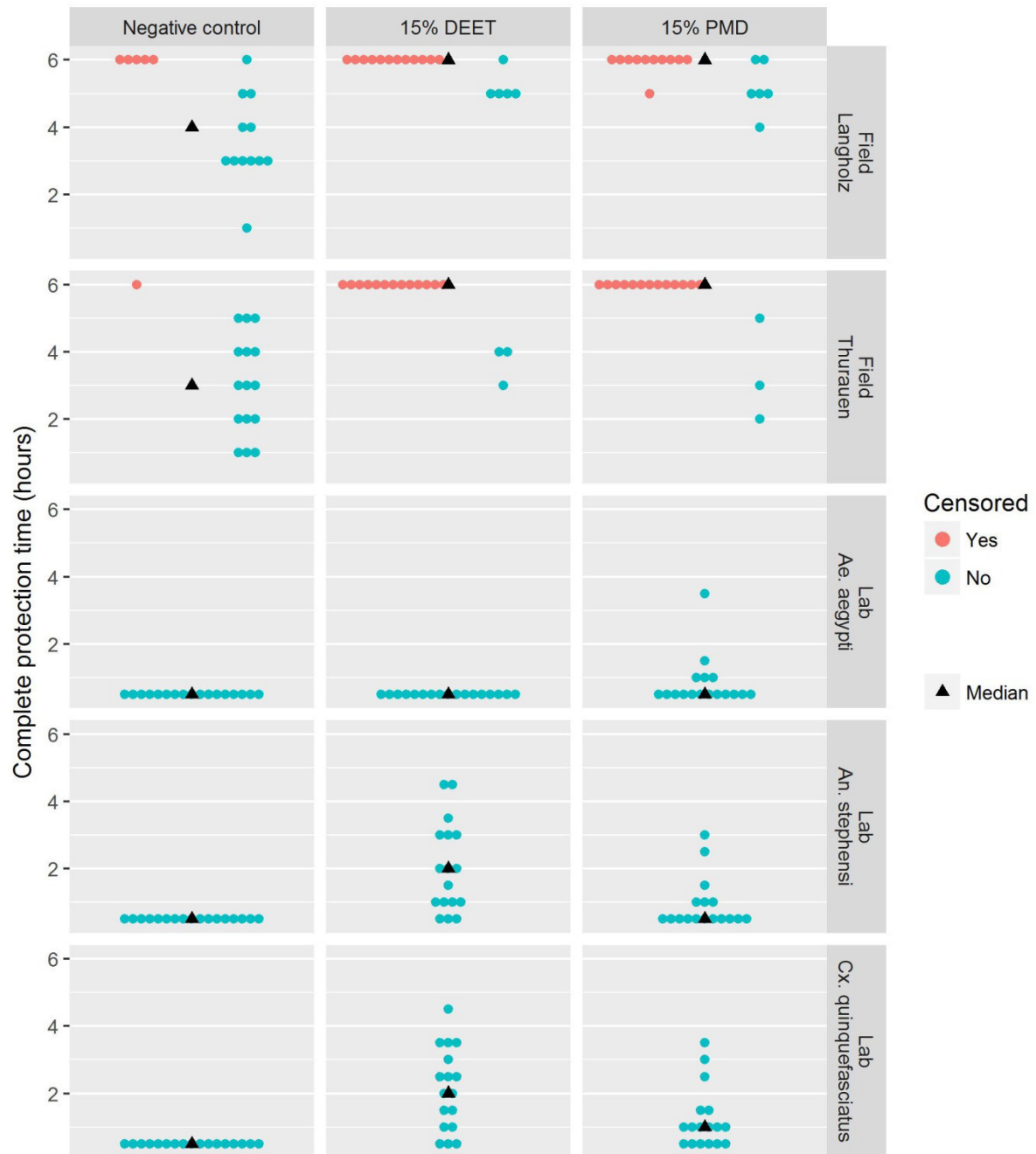
Supplementary Material

Evaluation of standard field and laboratory methods to compare protection times of the topical repellents PMD and DEET

Barbara Colucci and Pie Müller



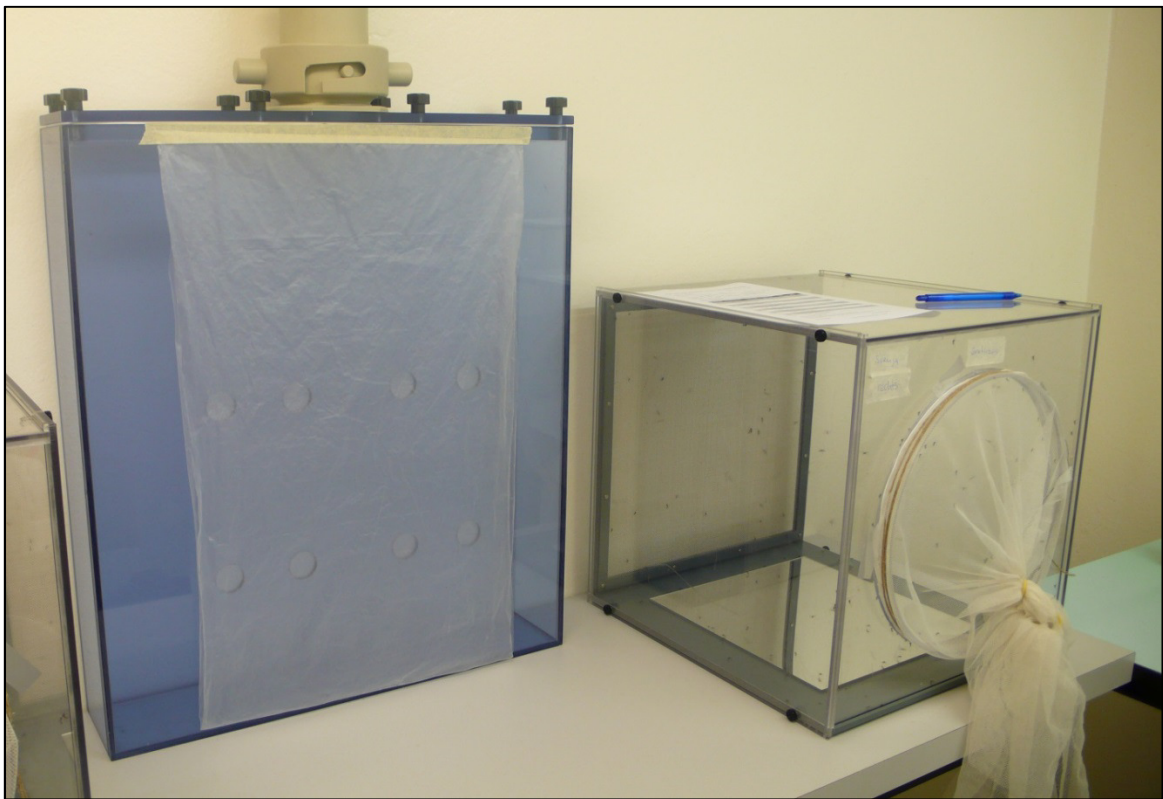
Supplementary Figure S1. Rotation scheme for the treatments in the field experiments. Each study participant was received each treatment (i.e. 15% DEET, 15% PMD and the negative control) once on three different days in each field site. The 18 participants were split into 3 groups, A, B and C. However, from the 18 participants enrolled in the study, one person dropped out, therefore, only 5 participants were included in group B.



Supplementary Figure S2. Complete protection time (CPT). The CPT is the time from the application of the repellent till the first landing of a mosquito on the treated area. „Censored“ means that there was no landing observed before concluding the experiment at 6 hours post application. The points show the measured CPTs for each experiment and study participant.

Chapter 5

A new air ventilation system for repellent testing with the WHO arm-in-cage test



Air ventilation system (blue box) next to a WHO test cage

A new air ventilation system for repellent testing with the WHO arm-in-cage test

Barbara Colucci ^{1,2,*} and Pie Müller ^{1,2 *}

¹Department of Epidemiology and Public Health, Swiss Tropical and Public Health Institute, Socinstrasse 57, PO Box, 4002 Basel, Switzerland

²University of Basel, Petersplatz 1, 4003 Basel, Switzerland

* Corresponding author

pie.mueller@swisstph.ch

E-Mail addresses

BC: barbara.colucci@swisstph.ch

PM: pie.mueller@swisstph.ch

Abstract

The arm-in-cage test is the standard method in the laboratory to test the efficacy of topical mosquito repellents. Earlier studies have also shown that mosquitoes change their behaviour during the course of a study. One hypothesis is that mosquitoes become adapted to odours trapped inside the cage and hence are less responsive to neither the repellent nor the human odour cues. In order to test whether air trapped inside the cage may influence mosquito behaviour I ran a study to find out if air ventilation has an influence on the biting behaviour of the mosquitoes. Ten participants were testing DEET 30% and PMD 30%, two commonly used active ingredients in commercially available mosquito repellents, against laboratory reared *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti* in the standard WHO arm-in-cage test, with and without airing the cage using a new air ventilation system.

The complete protection times measured against *Ae. aegypti* with air ventilation were between 0.5 – 1.5 hours for DEET 30% and between 0.5 – 1 hour for PMD 30%. Without air ventilation the protection times for DEET 30% were between 0.5 and 2 hours and for PMD

30% 0.5 and 1 hour. DEET 30% repelled *An. stephensi* between 0.5 – 5 hours and PMD 30% protected the study participants between 0.5 – 1.5 hours with the air ventilation. Without air ventilation DEET 30% protected for 1 – 5 hours and PMD 30% for 0.5 – 2 hours.

Additionally, it was observed that mosquitoes influenced by the air flow were more active over time in an arm-in-cage experiment. The differences between the complete protection times were not significant but the mosquitoes in air-ventilated cages seemed to remain more active over time. Controls of mosquitoes landing activity were also tested before and after the six hour experiments. In contrast to the repellents the landing rates in the negative controls before and after the experiments were slightly different and *Ae. aegypti* showed more activity compared to *An. stephensi* after the six hour experiment related to the landing rate at the beginning.

Introduction

Mosquitoes (Diptera, Culicidae) are important vectors of several diseases such as malaria, filariasis and viral infections, including dengue, West-Nile, chikungunya and Zika mainly in the tropical and subtropical regions but also increasingly in Europe as recent autochthonous cases of dengue and chikungunya show [1, 2]. Travellers to disease endemic countries are advised to avoid mosquito bites by using topical repellents and appropriate clothing [3, 4]. Topical repellents for application on the skin provide good protection against mosquito bites up to several hours [5-9]. Mosquito repellents are usually tested under laboratory conditions and there exist guidelines such as the one from the United States Environmental Protection Agency (US EPA) [10] and the World Health Organisations “Guidelines for Efficacy Testing of Mosquito Repellents for Human Skin” [11]. Obermayr *et al.* [12] presented repellent tests with BG-cages and conventional cages combined with an air ventilation system.

Cages size and mosquito density has an influence on the biting behavior of mosquitoes as shown by Barnard *et al.* [13]. Ten participants tested DEET 30% and PMD 30%, two commonly used active ingredients in commercially available mosquito repellents, against laboratory reared *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti* in the standard WHO arm-in-test cage test, with and without airing the cage using a new air ventilation system.

Material and Methods

The used air ventilation system consists of a blue box with 8 ventilation slots. The forced ventilation replaced the air in the WHO test cage 11 times in per minute. Every study

participant tested one repellent per day with two different mosquito cages. After a maximum of 3 minutes exposure time both cages were placed in front of the air ventilation system whereas one of them was ventilated for 2 minutes and the other was in front of closed ventilation slots.

Study participants

Ten study participants (8 females, 2 males) that took already part in the previous study (chapter 4) with an age between 23 – 29 years old were. All received written explanations about the experiment, the repellent formulations and the mosquitoes and had to sign a written consent form. Only students with low or little skin reactions on mosquito bites were allowed to participate. The subjects were advised to avoid alcohol and cosmetic products such as perfume, cologne, lotions for at least twelve hours before and during the test. They were also advised to avoid rubbing, touching or wetting the treated area as well as any activity that might lead to increased perspiration during the experiments. The study was approved by the Ethics Commission of Northwest and Central Switzerland (EKNZ 220/10) and all study participants signed the informed consent form.

Test formulations

The two repellents of interest were DEET 30% (m/m) and PMD 30% (m/m) on an ethanol base. The repellents were provided by Vifor Consumer Health AG (Villars-sur-Glâne, Switzerland). DEET was chosen because it is still the most effective repellent [14, 15], while PMD is a natural based repellent with DEET like effects [16, 17]. Each person tested both formulations against laboratory-reared *Ae. aegypti* and *An. stephensi*.

Test procedure

The laboratory experiments were conducted at Swiss TPH in Basel from May 16th – September 19th 2016. Testing and rearing conditions for all mosquito colonies were maintained at 27±2°C and 60%±10% relative humidity (RH) and a 12:12 (light:dark) photoperiod. In the experiment, the forearm (wrist to elbow) of a study participant was treated with one of the two repellent formulations at an application rate of 1 ml per 600 cm². The forearm was washed with odourless soap, dried with a towel, rinsed with 70% ethanol and then dried again with towel. The surface area was measured the following way: the circumference (cm) of the forearm at the wrist plus the circumference (cm) at the middle of the forearm plus the circumference (cm) of the elbow was divided by 3 and then multiplied

by the length of the forearm (distance from the wrist to the cubital joint). Both arms were treated with one repellent and were tested with one mosquito species per day.

In the test room there were four positions (labeled 1-4) for the WHO cages and two study participants per day tested one repellent. Before applying the repellent, the readiness of mosquitoes to land and probe was assessed by inserting the washed, untreated forearm into the experimental cage for 60 seconds or until 10 landings/probings were counted. The participant's hand was protected by a latex glove through which mosquitoes could not bite. Thirty minutes after application of the repellent the participant exposed the treated forearm to the mosquitoes in the test cage for 3 minutes. The procedure was repeated every 30 minutes and ended after 6 hours. Every subject had two cages filled with mosquitoes whereas just one of them was ventilated with the new system. After every exposure both cages were placed in front of the air ventilation system. One cage was in front of the system with closed ventilation slots and after two minutes the other cage of the same person was placed at the same position but with open ventilation slots that replaced the air in the cage 11 times within two minutes. After putting all four cages in front of the air ventilation system for two minutes all cages were moved carefully one position further (1-4, clockwise) to avoid bias by cage position in the test room.

The time of the first and the second landing of a mosquito on the treated forearm was noted as well as the time until the 10th landing occurred. A landing was defined as a mosquito staying on a treated area for at least 2 seconds. During the exposure time volunteers were allowed to shake off the mosquitoes before they started biting, preventing an excessive number of bites during the 6 hours of the experiment. After 6 hours the arms were cleaned in the same way as before the experiment and the activity of the mosquitoes was re-assessed.

Test cages

The repellent efficacy tests followed the WHO guidelines for the arm-in-cage test [11]. Test cages (40 cm x 40 cm x 40 cm) were made of clear acrylic glass sides with an opening on the front side. At the bottom of the cage was a mirror positioned to ensure observation of mosquito landings on the side hidden from view of the arm. The back side of the cage was made of a fine metal grid to ensure air supply during the experiments.

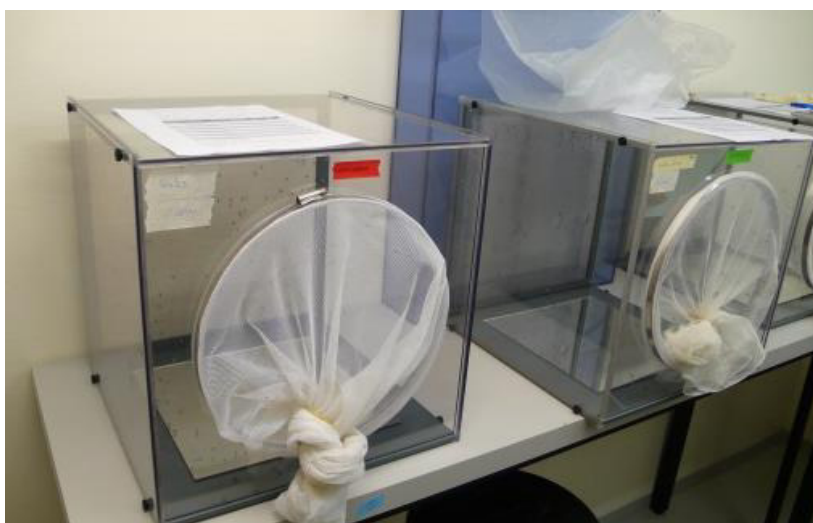


Figure 1: Red labelled WHO test cage (no air ventilation) next to a green labelled test cage that is in front of the air ventilation system with open slots.

Insects

Adult mosquitoes of the two species *Ae. aegypti* and *An. stephensi* of our laboratory colonies with an age of 5-10 days reared at Swiss TPH Basel were fed with 10% sucrose solution and provided with water *ad libitum*. Testing and rearing conditions for all mosquito colonies were maintained at 27 ± 2 °C and $60\% \pm 10\%$ relative humidity (RH) and a 12:12 (light:dark) photoperiod.

Experiments with *Ae. aegypti* were performed during daytime and started between 9 and 9.30 am. Tests with *An. stephensi* were conducted in the dark between 1.25 and 1.45 pm when the in our laboratory was off to adjust the experiments with the daily activity patterns of the mosquitoes. As of 12 hours before the experiment, the mosquitoes had only access to water without sugar. Each volunteer tested one repellent per day in a WHO test cage filled with two hundred non-blood fed female mosquitoes.

Data analysis

Raw data recorded on protocols were entered on a Microsoft Excel 2010 spread sheet and every entry double-checked. In addition the entries were inspected for outliers and inconsistencies. Statistical analysis was performed in the open source statistical package R version 3.4.1 [18], while the graphs were produced with the R package “ggplot2” [19]. The endpoint measured in the experiments was the number of mosquitoes landing on the skin during the exposure period.

Results

The complete protection times measured against *Ae. aegypti* with air ventilation were between 0.5 – 1.5 hours for DEET 30% and between 0.5 – 1 hour for PMD 30%. Without air ventilation the protection times for DEET 30% were between 0.5 and 2 hours and for PMD 30% 0.5 and 1 hour.

DEET 30% repelled *An. stephensi* between 0.5 – 5 hours and PMD 30% protected the study participants between 0.5 – 1.5 hours with the air ventilation. Without air ventilation DEET 30% protected for 1 – 5 hours and PMD 30% for 0.5 – 2 hours.

The landing rates are shown in Figure 1 for each participant, repellents and mosquito species. The slopes of the estimated, average landing rates measured from ventilated cages seem to be slightly steeper (i.e. higher landing rates) suggesting the mosquitoes were slightly more active in those cages but the difference is statistically not significant. The publication of Obermayr et al. [12] compared two different cage sizes whereas just the smaller one was equipped with an air ventilation.

Each study participant tested one repellent with two cages, one with and the other without air ventilation. To test the biting activity of the mosquitoes the number of landings per seconds on untreated arm was counted before and after the experiment. Landing rates were higher before than after the experiment and this for both designs (with and without) air ventilation (Figure 3).

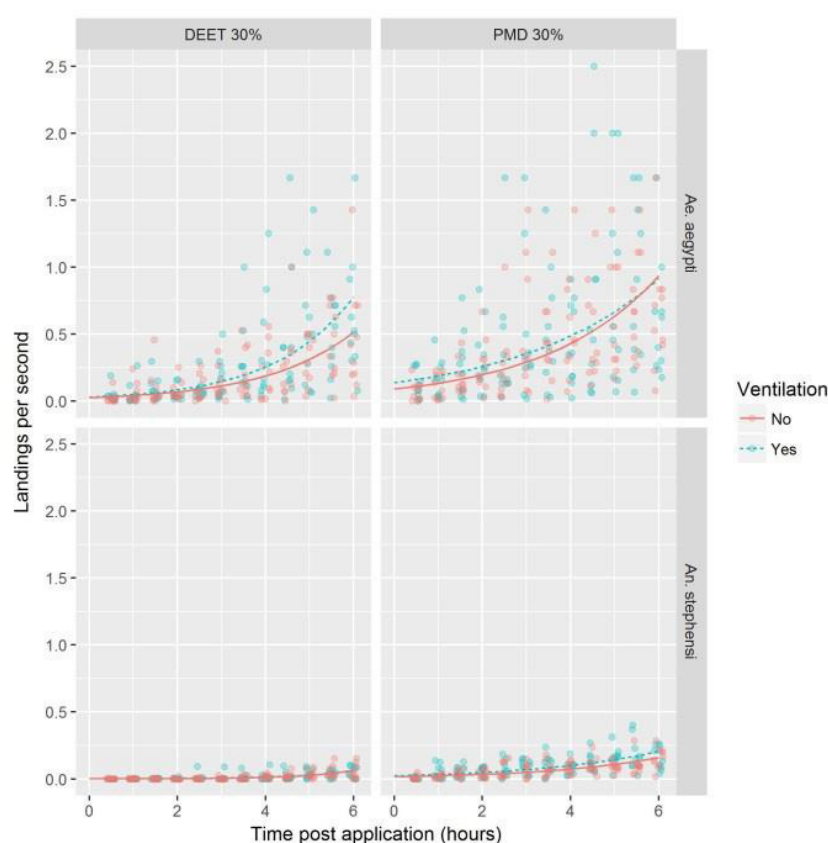


Figure 2: Landing rates per second for both mosquito species and the two repellents DEET 30% and PMD 30%. The curve with the air ventilations shows slighter active mosquitoes over time but the difference is not significant.

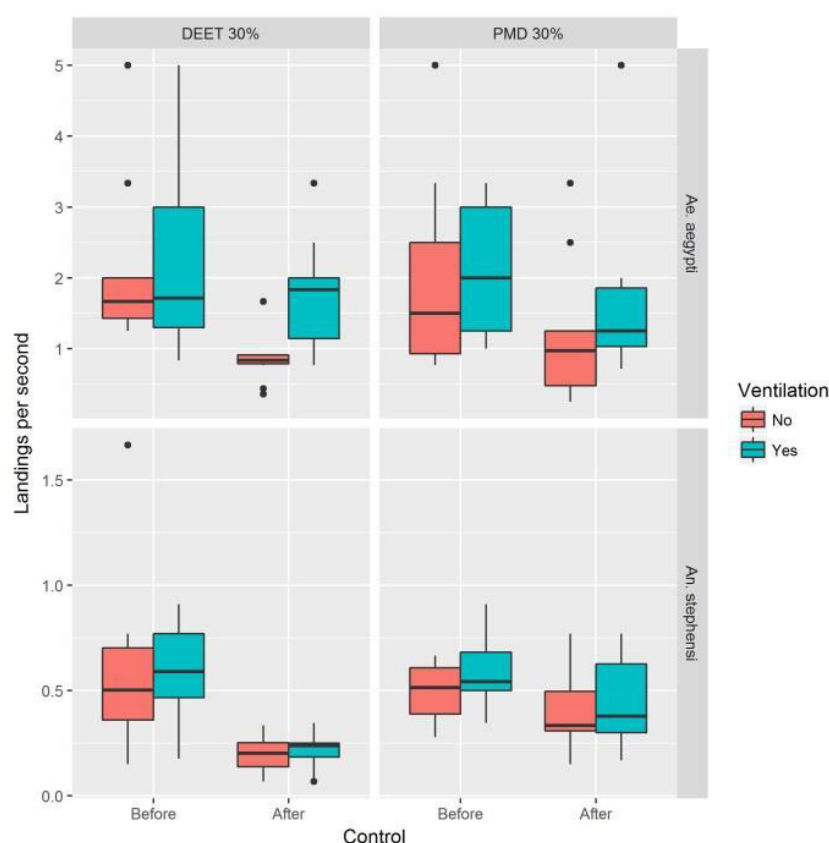


Figure 2: The landings per second for *Ae. aegypti* and *An. stephensi* before and after the 6 hour experiment with the two repellent DEET 30% and PMD 30%.

In the experiment with the air ventilation system the mosquitoes showed a different behaviour than without ventilation. As soon as I placed the cage in front of the air ventilation system with the ventilation slots open the mosquitoes started to fly up wind for ca. 10 seconds and then stayed for the remaining two minutes on the net facing the ventilation box. I had never observed that behaviour before. Usually almost the mosquitoes would rest on the metal screen at the back of the WHO test cage.

Discussion

The difference between the average complete protection time with and without the air ventilation system was statistically not significant. It can be observed that mosquitoes influenced by the air flow might be more active (more landings per second) over time in an arm-in-cage experiment with the repellents.

I suggest that this behaviour has two main reasons: it is probably much easier for the insects to hold on the metal mesh wall than on the acrylic glass and the other reason might be the fresh air entering through the mesh.

It was important to know that the mosquitoes are not stressed for a longer time period after being exposed to the air flow. In a previous test I observed the mosquitoes after a two minutes air flow and latest 3 minutes after closing the air ventilation system all mosquitoes

stayed on the net and were not flying around. As exposition rhythm in an arm-in-cage test are 30 minutes the mosquitoes had more than enough time calm down after an air flow event of 2 minutes. The differences of protection times with and without air ventilation was statistically not significant but the mosquitoes in air ventilated cages stayed more active over time.

Acknowledgements

Many thanks to Dr Burkhard Kriwet from Vifor Consumer Health AG (Villars-sur-Glâne, Switzerland) for preparing the active ingredients on ethanol base. Thanks to the mosquito rearing team at Swiss TPH for their support. A special thank goes to the study participants for their great collaboration in the experiments. This experiment was funded by the Freiwillige Akademische Gesellschaft (FAG) Basel.

References

1. Tomasello, D. and P. Schlagenhauf, *Chikungunya and dengue autochthonous cases in Europe, 2007-2012*. Travel Med Infect Dis, 2013. **11**(5): p. 274-84.
2. Gjenero-Morgan, I.A.B., Krajcar D., Lesnikar, V., Klobucar, A., Prem-Novosel, I. et al. , *Autochthonous dengue fever in Croatia, August-September 2010*, in *Euro Surveillance: bulletin européen sur les maladies transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*. 2011.
3. Moore, S.J., A.J. Mordue, and J.G. Logan, *Insect Bite Prevention*. Infectious Disease Clinics of North America, 2012. **26**(3): p. 655-+.
4. Prevention, C.f.D.C.a. *Insect Repellent Use & Safety*. 2015 [cited 2017 2017-09-10]; Available from: <https://www.cdc.gov/westnile/faq/repellent.html>.
5. Moore, S.J., A.J. Mordue Luntz, and J.G. Logan, *Insect bite prevention*. Infect Dis Clin North Am, 2012. **26**(3): p. 655-73.
6. Debboun, M., Strickman D.A. and Klun, J.A., *Repellents and the Military: Our First Line of Defence*. 2005, MDtravelhealth.com.
7. Goodyer, L.I., et al., *Expert Review of the Evidence Base for Arthropod Bite Avoidance*. Journal of Travel Medicine, 2010. **17**(3): p. 182-192.
8. Dickens, J.C. and J.D. Bohbot, *Mini review: Mode of action of mosquito repellents*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2013. **106**(3): p. 149-155.

9. Katz, T.M., Miller, J. H., Hebert, A.A., *Insect repellents: Historical perspectives and new developments*. Journal of the American Academy of Dermatology, 2008. **58**(5): p. 865-871.
10. US_EPA, *EPA: Product Performance Test Guidelines*. 2010, United States Environmental Protection Agency.
11. WHO, *Guidelines for Efficacy Testing of Mosquito Repellents for Human Skin*. 2009, Geneva: World health Organization.
12. Obermayr, U., A. Rose, and M. Geier, *A Novel Test Cage With an Air Ventilation System as an Alternative to Conventional Cages for the Efficacy Testing of Mosquito Repellents*. Journal of Medical Entomology, 2010. **47**(6): p. 1116-1122.
13. Barnard, D.R., et al., *Mosquito density, biting rate and cage size effects on repellent tests*. Medical and Veterinary Entomology, 1998. **12**(1): p. 39-45.
14. Koren, G., Matsui, D. and Bailey, B., *DEET-based insect repellents: safety implications for children and pregnant and lactating women*. Canadian Medical Association Journal, 2003. **169** (3).
15. Sudakin, D.L., Trevathan, W. R., *DEET: A Review and Update of Safety and Risk in the General Population*. Journal of Toxicology, 2003. **41**: p. 831-839.
16. Carroll, S.P. and J. Loye, *PMD, a registered botanical mosquito repellent with deet-like efficacy*. J.Am.Mosq.Control Assoc., 2006. **22**(3): p. 507-514.
17. Trigg, J.K., *Evaluation of a eucalyptus-based repellent against Anopheles spp. in Tanzania*. J Am Mosq Control Assoc, 1996. **12**(2 Pt 1): p. 243-6.
18. Team, R.D.C., *R: A language and environment for statistical computing*. 2017, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. .
19. H., W., *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. 2 ed. 2016: New York: Springer Nature.

Chapter 6

GENERAL DISCUSSION AND CONCLUSIONS



Nature Reserve Langholz, 2014

GENERAL DISCUSSION AND CONCLUSIONS

1. Discussion on Objective 1 – Review of studies with mosquito repellents

The importance of mosquito repellents – and finding the right one

Mosquito repellents provide good protection against mosquito bites for travellers to areas where the risk of mosquito transmitted diseases is high [1-3]. For many of the mosquito-borne diseases neither a vaccination nor a specific treatment is available and even in the absence of pathogens mosquitoes are a serious nuisance preventing people from staying outdoors and bites may lead to itching, skin irritations, pain, allergic reactions [4] or serious secondary infections. Repellents should always be reapplied after swimming or sweating because they are water-soluble. The analysed studies on protection times used the recommended repellents such as DEET [5-35], PMD [11, 16, 22, 29, 30, 33], EBAAP [13, 14, 23, 26, 33, 36] and Icaridin [23, 29, 31-33, 36-38] and data are presented in three different tables for laboratory, field and combined field and laboratory studies.

Laboratory experiments

Arm-in-cage tests are the standard method for testing mosquito repellents under standardised conditions in the laboratory and the guidelines of WHO [39] and US EPA [40] should be taken as the base for experimental designs. I found many differences in the analysed studies concerning the size of the test cages, the number of mosquitoes per cage, the mosquito species, the number of study participants, the measurement of repellent efficacy, the definition of a bite, the application rate and the treated surface area exposed in to the mosquitoes, the mosquito rearing conditions and the repellent concentrations.

As an example, the guidelines of WHO [39] recommend a cage size of 35-40 cm per side filled with 200-250 female mosquitoes. In the study of Tavassoli *et al.* [17] the cages size had a volume of 125,000 cm³ and was filled with 150-170 mosquitoes, whereas Logan *et al.* [9] used 50 mosquitoes with the same cage size. The laboratory studies of Auysawasdi *et al.* [5], Yoon *et al.* [41], Webb *et al.* [10], Trongtoit *et al.* [11], Tawatsin *et al.* [12, 15], Cilek *et al.* [13], Obermayr *et al.* [37], Govere *et al.* [16] used test cages within the recommend size but the number of mosquitoes varied from 30 to 250 individuals.

Barnard *et al.* [42] and Khan *et al.* [43] showed that cage size and mosquito density has an influence on mosquito behaviour and biting activity. The repellent protection time decreases as mosquito density increases.

The recommended amount of repellent, 1 ml repellent per 600 cm² arm area, was only followed in the studies of Bissinger *et al.* [44], Trongtoit *et al.* [11], Obermayr *et al.* [37], Solomon *et al.* [18].

Field trials

The study of Frances [27] presented data on DEET at concentrations of 35% and 40% with protection times against *Cx. annulirostris*, *Ae. vigilax* and *Ma. uniformis* of 3 and 6 hours. Uzzan *et al.* [29] presented data from a field study with 100 volunteers from Senegal where commercial products with 50% DEET, 30% PMD and 20% Icaridin showed similar protection against local mosquito populations of *An. gambiae*, *Culex* and *Mansonia* species. It has, however, to be mentioned that the amount of applied repellent was extremely high; 15 ml per lower leg. In other studies repellents were tested with 1 ml per 550 – 650 cm². Frances *et al.* [20] tested commercial products containing 35% DEET and 7.5% EBAAP in Australia. 35% DEET protected for 5 hours against *Cx. annulirostris*, *Ae. vigilax* and *Ma. uniformis* whereas 7.5% EBAAP protected for 1 hour.

Schofield *et al.* [21] tested 3 commercial products with the active ingredient (AI) DEET at concentrations of 30%, 31.58% and 33.33% with 4 volunteers in Canada. *Oc. sticticus* and *Ae. vexans* were the dominant species in these areas and all 3 repellents showed protection for more than 10 hours against mosquito bites. The study of Qualls *et al.* [28] conducted in Florida against the floodwater mosquito *Psorophora columbiae* impressed with three plant based repellents (AI concentration from 7.75 – 30%) that protected longer against bites than DEET 15%. Moore *et al.* [30] tested plant based repellents and DEET in the Bolivian Amazon. DEET showed slightly better protection against mosquitoes of the species *Psorophora varipes*, *Ae. ochlerotatus* and *An. darlingi*. Frances *et al.* [38] tested three repellents were DEET 80% protected the participants, four in total, for more than 8 hours against *Cx. annulirostris*, *Oc. normanesis* and *An. meraukensis*. Frances *et al.* [31] tested commercial and non- commercial products containing DEET or Icaridin. DEET protected for more than 7 hours against *Cx. annulirostris*, *An. bancroftii* and *An. meraukensis*. In a study conducted in Australia, Frances *et al.* [32] showed DEET and Icaridin provided longer lasting protection against the mosquito species *Verrallina lineata*, *Oc. kochi*, *An. fairauti* and *Oc. notoscriptus*. Barnard *et al.* [33] tested DEET 25%, Icaridin 25%, EBAAP 25% and PMD 40% in the Everglades, USA, against the salt water mosquito *Oc. taeniorhynchus* and the complete protection times were 3 hours for EBAAP, 3.8 hours for PMD, 5.4 hours for Icaridin and 6.6 hours for DEET. In the field experiment of Debboun *et al.* [34] in New York two repellents were tested alone and in combination whereas the protection time was not increased by combining DEET and AI3-37200 (a piperidine). The protection time was at least 4 hours against *Ae. communis* for all repellents. Walker *et al.* [35] tested the lowest

concentrations of the AI with DEET 5% and AI3-37220 5% and the measured relative protection was >80% for DEET after 3 hours and AI3-37220 protected 89.8% after 9 hours against *An. funestus* in Kenya.

Naucke *et al.* [36] tested non-commercial sprays and lotions with EBAAP (10%, 15% and 20%) and Icaridin 10% and 20% in Brazil. All products protected the participants in the field for more than six hours against *Ae. aegypti* with one exception of the lotion with EBAAP 10% where a protection of 4 hours was measured.

Field experiments in Senegal, Kenya, Australia, USA and Canada showed that DEET was protecting for many hours against different mosquito genera such as *Culex*, *Anopheles*, *Aedes* and *Mansonia*, depending on the applied concentration of the AI. A study in Brazil [36] presented data of field experiments with Icaridin and EBAAP and both repellents protected more than four hours against *Ae. aegypti* even with low concentrations of the AI (e.g. 10%). DEET was the most used repellent and showed good protection times against different mosquito species all over the world.

Study participants

In general it is observed that the numbers of the participants in the field experiments were low with three [27] to twelve [35] volunteers with the exception of the study of Uzzan *et al.* [29] where data with 100 volunteers were presented. Fradin *et al.* [14] tested with 15 volunteers, Carroll *et al.* [22] with 2-20 participants. The individual attractiveness of the study participants has an influence on the protection time [45] and therefore the number of participants should be sufficient to allow statistical analysis [39].

Amount of repellent applied on the skin

Another issue I identified is that the amount of the applied repellent seems to vary between field and laboratory assays, even within the same study. For example, Thavara *et al.* [26] presented data with DEET 20% where the repellent protected the volunteers for more than 8 hours in the field trial (0.76 - 0.84 mg AI/cm²) and for certain species for over 9 hours in the laboratory (0.66 - 0.67 mg AI/cm²) experiment. The difference in the applied amount of repellent between the two experiments makes a comparison very difficult. Different application rates in field and laboratory trials were also observed in Trongtokit [24], Champakaew *et al.* [19] and Schofield *et al.* [21].

In the 15 reviewed laboratory studies that were all published between 2000 and 2016 the cages size and the number of mosquitoes per cage varied in such an enormous way that the results are not comparable. It is difficult to understand why the WHO guidelines were not followed despite their first publication in 1996 and revised 2009 [39]. Standardised methods are extremely important to make studies comparable and I would expect following the guidelines in laboratory tests would be even easier than in field trials.

Landing/biting rates in field trials

Field studies should always measure a complete and a relative protection time due to the differences in biting pressure/landing rates and environmental influences. The landing rates reported in Naucke *et al.* were 3.2 and 34 mosquitoes per hour for the control person, while the biting rates in the study of Debboun *et al.* [34] were 10.8 to 18.4 bites per 15 minutes. A landing rate of 0.65 and 0.77 was reported in the paper of Kröckel *et al.* [46] from a study conducted in Belo Horizonte, Brazil. Another study from Australia published by Canyon *et al.* [47] showed rates of 10.2 to 21.6 or less than 4 landings per hour and a study from Thailand and southern England reported 4.18, 0.38 or 0.21 bites per hour for three different field sites [48].

The studies that combined field and laboratory trials presented only the landing rates measured in the field experiments. Frances *et al.* counted 21.2 and 11.3 bites per 10 min for the untreated person [23]. The mean biting rate for the control persons in Tuetun *et al.* [25] was 5.5 bites per 10 minute. In their field trial, Carroll and Loye [22] presented biting rates of 1.5 per minute on the untreated arm and 3 per minute on the untreated leg. Frances *et al.* [49] counted 24.0 ± 5.2 bites per 10 min and Champakaew *et al.* [19] report a mean collecting rate from 2 to 204.2 mosquitoes per 20 minutes in the field trial.

Conclusions and recommendation

During laboratory studies landing rates were extremely high compared to the field experiments across different studies. An explanation for this observation might be that, in contrast to mosquitoes in a laboratory tests, they first have to find the human host, taking more time and, therefore, influencing the landing/biting rate.

The experimental designs of the field trials were extremely diverse and therefore hard to compare as presented in the review. It is, therefore, extremely difficult to predict protection times for field trials based on data gained in laboratory experiments. Nevertheless, repellents that showed good protection under laboratory conditions were also effective in the field. Not all active ingredients repel all mosquito species in the same way.

I would highly recommend travellers to inform themselves about the local mosquito population at their travel destination. It is important to get the repellent with the suitable active ingredient to protect the user in the most appropriate way and always in combination with appropriate clothing and if necessary bed net during the night.

2. Discussion on Objective 2 – Field sites in Switzerland

There was not that much known about mosquito diversity, abundance and densities during summer time in Switzerland. Originally, my plan was to conduct one of my field trials in Ticino, where the Asian tiger mosquito, *Ae. albopictus* is present [50], because there is an increasing interest in knowing how well repellents work against this invasive mosquito species. However, for my field experiments, I was looking for locations that have previously not been treated with insecticides against neither mosquito larvae nor adults to avoid human influence on local mosquito diversity. Yet, in Ticino there is surveillance and control programme in place that also uses insecticides and, therefore, I had decided to implement my field studies elsewhere in Switzerland.

One of my study sites was the Langholz Nature Reserve. Langholz is a forest area located in the Canton of Aargau, Switzerland and is frequently visited by walkers, bikers, joggers and others. Newly build dams flood large parts of the forest area and different ponds and tarns were created. The aim of the study (in collaboration with the Canton of Aargau) was to investigate influence of flooding the area with water on the mosquito diversity and abundance in the Langholz area. This survey was part of the pilot study to identify suitable locations in Switzerland for my field trials. Indeed, in Langholz we found the highest mosquito species diversity ever reported in one location in Switzerland [51]. We also detected the invasive mosquito *Ae. japonicus* [52]. The pilot study showed ideal conditions for the large field experiments. As the WHO [39] recommends two different locations for repellent testing in the field we included another location.

Following discussions with colleagues from Zurich we decided to conduct the second field trial in the Thuraun area [53]. This Nature Reserve was in the media for its high numbers of the floodwater mosquito *Ae. vexans*, an aggressive, day-active mosquito. The Canton of Zurich treated several water bodies with *Bacillus thuringiensis israelensis* (BTI) [54, 55] to reduce the larvae survival but we found several large, non-treated areas that were ideal for my second field experiment.

3. Discussion on Objective 3 – Field and laboratory experiments with 18 participants

The information flyer (see Appendix) with study details and the working dates was sent out to 540 students. After an e-mail exchange with more than 350 e-mails, 46 students (32

females and 14 males) were invited for a short interview. By lot 18 of the suitable study participants were picked and all of them received detailed information about the study procedures and signed a consent form. Due to the great support of both cantons, Aargau and Zurich, all permissions for the work in the Langholz and Thuraue Nature Reserves were received on time and everything could start as planned.

The summer 2015 was extremely dry and hot [56] what negatively influenced the presence of mosquitoes in both study areas. With the record temperature of 33.5 °C in the forest the present mosquitoes were not as active as they usually would be in summer time [51, 53].

In the laboratory experiment we used different mosquito species than we had in the field because indigenous mosquitoes such as *Ae. vexans* might be difficult or impossible to colonise in the laboratory. Yet, *Cx. quinquefasciatus* that was reared at Swiss TPH is closely related to the *Culex* species we have in Switzerland.

The recommended standard method to test repellents in the field is the Human Landing Catch (HLC) [39, 57, 58]. In tropical or subtropical areas where the probability of disease transmission is high the participants are at risk [57]. Alternative methods are presented in the study of Govella *et al.* [59] with the tent trap but these were not as sensitive as the HLC. Other traps were tested and compared with the HLC in the study of Tangena *et al.* and the results showed that human-baited double net (HDN) trap is a cheap alternative to measure human biting rates [60]. There is still a risk of disease transmission and alternative methods are difficult to find. One new catching method is described in the publication of Maliti *et al.* [61] with the electrocuting traps or CDC light traps that are placed next to bed nets to catch anthropophilic mosquitoes. The Infoscitex tent presented in the Krajacich *et al.* study is a safe alternative to catch mosquitoes of the genera *Culex* and *Anopheles* but less effective for *Aedes* [62].

As our experiments have shown mosquito repellents do not protect every subject in the same way against the same mosquito species. In our laboratory experiment DEET protected well against *An. stephensi* and *Cx. quinquefasciatus* and the protection against *Ae. aegypti* was extremely short. Therefore I highly recommend travellers to get information about the local mosquito population in their travel destination to be prepared with the most suitable repellent.

4. Discussion on Objective 4 – New air ventilation system

Biting or landing rates of mosquitoes are influenced by the density, cage size and repellent concentration [42, 43]. This fact is important in view to protection times measured in laboratory experiments. I observed in earlier experiments that mosquitoes became less active the longer an experiment lasted and therefore I designed an experiment where the air flow of a ventilation system replaces the air in the WHO test cage. The results showed no significant differences in the duration of the protection times against the two mosquito species *An. stephensi* and *Ae. aegypti* but it was observed that the landing rates per second were much higher before the experiment than after six hours exposure time. It can be observed that mosquitoes influenced by the air flow might be more active (more landings per second) over time in an arm-in-cage experiment with the repellents. Another option could be a different design for the ventilation system. If possible, it would be interesting to inflow fresh air instead of replacing contaminated air by depression.

Critical view

Travel medicine

Mosquito repellents applied to the skin are a good solution for travellers to be protected against bites in areas where disease transmission by mosquitoes is high but appropriate clothing and the use of bed nets during the night is important as well. Seven active ingredients exist that were tested to be efficient [63] and four of them are widely used in most of the insect repellents all over the world. These are DEET, Icaridin, PMD and EBAAP [64]. The concentrations of these repellents vary and depending on the biting pressure a higher concentration of the active ingredient is needed. In Europe concentrations of 10-30% of the active ingredient are deemed sufficient whereas in areas with a high biting pressure and disease transmission concentrations of 50-100% are recommended. It is important to know what local mosquito species are present in their destination of travel and travellers should get that information in advance to be prepared. Information sources for travellers can be the internet (CDC, US EPA) in combination with a consultation of a physician with background in tropical medicine (e.g. at Swiss TPH). Travellers should know if there are day biting mosquitoes or dusk and dawn biters present. To be protected against day or dusk biting mosquitoes, repellents and appropriate clothing is important whereas the best protection against night biting mosquitoes is the bed net, potentially in combination with repellents. The results of the review and our own studies have shown that not all mosquito species are repelled in the same way by the available active ingredients. This is another

reason why it is important to know what local mosquito species are present at the target destination.

Label claim

The information on the label is often quite short concerning the use of a product. It would be important for the proper use to mention the correct way of application of the repellent (skin or clothes), the amount (ml per area or puffs) or the important hint: “shake before use”. Most of the repellents consist of several ingredients such as perfumes, fixatives, active ingredient and more and, therefore, shaking is important. Some active ingredients e.g. DEET dissolve plastics and a warning on the label would be helpful for the user.

Laboratory experiments

The test method in the laboratory (arm-in-cage test) is well explained in the guidelines of the WHO [39] and US EPA [40] and to get comparable results I would highly recommend to follow these guidelines. The landing/biting pressure in a WHO test cage is extremely high compared to what has been reported in the reviewed publications as well as what was found in our own studies. It would be interesting to see what landing rates were measured in other laboratory experiments and how active the animals are before and after an experiment because these data were not presented.

Mosquitoes are exposed to the repellent treated forearm for several minutes, depending on the study, what has an influence on their activity as shown in our experiment with the air ventilation system. Our tests with the air ventilation system were performed with active ingredients at a concentration of 30% and maybe this was not high enough. With 30% we had already a tendency concerning landing rates in the controls and with further studies and concentrations of 50 or more per cent results could show significant differences.

Another idea was a different design for the ventilation system. If possible, it would be interesting to inflow fresh air instead of replacing contaminated air by depression.

Field trials

HLC is the standard method for testing repellent efficacy in the field (performance guidelines WHO [39]). The biggest problem is that people are exposed to potential vectors and the disease transmission cannot be excluded for 100%. Volunteers might be provided with malaria prophylaxis but there are also other pathogens transmitted by mosquitoes. The risk of collectors becoming infected is particularly high as soon as biting pressure is high and they are not able anymore to collect all landing mosquitoes fast enough to avoid getting bitten by a potentially infectious mosquito.

Field and laboratory trials

The number of study participants was often very low with 3 to 6 participants and some studies were just performed with males. As we know that there are many different factors that influence mosquito biting preference [45] it would be advisable to increase the number of participants to allow statistical analysis and to perform experiments with females and males [39].

The endpoint of an experiment means the definition of a landing/bite that defined the failure of a repellent was not always the same in the different studies. This means, that sometimes the first confirmed bite (i.e. second bite) or the third bite was measured to end the experiment.

Most of the repellent efficacy studies were performed in the laboratory and just a handful scientists conducted field and laboratory trials. The field trials are a big challenge in view to logistics, permissions, time management and organisation in general. The effort is immense! The whole planning process takes more time and working in the field is riskier in view to weather conditions and mosquito abundance.

Conclusion

Methods for repellent testing in the laboratory (arm-in-cage test) and in the field (HLC) are well explained in the guidelines of the WHO [39] and US EPA [40] and I would highly recommend following these guidelines to get comparable results. Arm-in-cage tests may underestimate the actual efficacy of a topical mosquito repellent because the landing rates in a test cage are extremely high compared to the field. The HLC is still the most accurate method to test the protection of a repellent against anthropophilic mosquitoes in the field but landing rates influence the protection time. It is important to measure the complete protection time because one bite in the field can be enough to get infected but I would highly recommend measuring the relative protection as well. Both time points should be presented in field trials and in the laboratory experiments because the activity of mosquitoes has an influence on the experiment.

Ideal field and laboratory experiments should have similar landing rates and tests are performed with the same study participants (equal numbers of females and males). The number of participants should be sufficient to allow statistical analysis and both endpoints (CPT and %R) are measured. The repellent contaminated air during studies with the WHO cage gets replaced after exposition to have active mosquitoes before, during and after and the repellent test.

As long as the experimental designs vary in such an enormous way despite existing guidelines an interpretation of the studies and the measured protection times is difficult. In

general it can be observed that repellents with good protection times in the laboratory were also effective in the field as shown in the review and my own field and laboratory studies.

References

1. Stanczyk, N.M., et al., *Mosquito repellents for travellers*. BMJ, 2015. **350**: p. h99.
2. Moore, S.J., A.J. Mordue, and J.G. Logan, *Insect Bite Prevention*. Infectious Disease Clinics of North America, 2012. **26**(3): p. 655-+.
3. Elston, D.M., *Prevention of arthropod-related disease*. Journal of the American Academy of Dermatology, 2004. **51**(6): p. 947-954.
4. Peng, Z.K., et al., *Immune responses to mosquito saliva in 14 individuals with acute systemic allergic reactions to mosquito bites*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2004. **114**(5): p. 1189-1194.
5. Auysawasdi, N., et al., *Improving the effectiveness of three essential oils against Aedes aegypti (Linn.) and Anopheles dirus (Peyton and Harrison)*. Parasitol Res, 2016. **115**(1): p. 99-106.
6. Bissinger, B.W., Kennedy, M. K., Carroll, S. P., *Sustained efficacy of the novel topical repellent TT-4302 against mosquitoes and ticks*. Med Vet Entomol, 2016. **30**(1): p. 107-11.
7. Tisgratog, R., et al., *Evaluation of a Noncontact, Alternative Mosquito Repellent Assay System*. J Am Mosq Control Assoc, 2016. **32**(3): p. 177-184.
8. Yoon, J.K., et al., *Development and Evaluation of a Semifield Test for Repellent Efficacy Testing*. Journal of Medical Entomology, 2014. **51**(1): p. 182-188.
9. Logan, J.G., et al., *Arm-in-cage testing of natural human-derived mosquito repellents*. Malar.J., 2010. **9**: p. 239.
10. Webb, C.E. and R.C. Russell, *Insect repellents and sunscreen: implications for personal protection strategies against mosquito-borne disease*. Australian and New Zealand Journal of Public Health, 2009. **33**(5): p. 485-490.
11. Trongtokit, Y., Curtis, C. F. and Rongsriyam, Y., *Efficacy of repellent products against cages and free flying Anopheles stephensi mosquitoes*. South East Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, 2006. **36** (6).
12. Tawatsin, A., Asavadachanukorn, P., Thavara, U., Wongsinkongman, P., Bansidhi, J. Boonruad, T., Chavalittumrong, P., Soonthornchareonnon, N., Komalamisra, N. and Mulla, M.S., *Repellency of Essential Oils Extracted from Plant in Thailand against four Mosquito Vectors (Diptera: Culicidae) and Oviposition Deterrent Effects against*

- Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). South East Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, 2005. **37** (5): p. 915-931.
13. Cilek, J.E., J.L. Petersen, and C.F. Hallmon, *Comparative efficacy of IR3535 and DEET as repellents against adult Aedes aegypti and Culex quinquefasciatus*. Journal of the American Mosquito Control Association, 2004. **20**(3): p. 299-304.
 14. Fradin, M.S. and J.F. Day, *Comparative efficacy of insect repellents against mosquito bites*. New England Journal of Medicine, 2002. **347**(1): p. 13-18.
 15. Tawatsin, A., et al., *Repellency of volatile oils from plants against three mosquito vectors*. J.Vector.Ecol., 2001. **26**(1): p. 76-82.
 16. Govere, J., et al., *Efficacy of three insect repellents against the malaria vector Anopheles arabiensis*. Medical and Veterinary Entomology, 2000. **14**(4): p. 441-444.
 17. Tavassoli, M., et al., *Repellency Effects of Essential Oils of Myrtle (Myrtus communis), Marigold (Calendula officinalis) Compared with DEET against Anopheles stephensi on Human Volunteers*. Iranian Journal of Arthropod-Borne Diseases, 2011. **5**(2): p. 10-22.
 18. Solomon, B., T. Gebre-Mariam, and K. Asres, *Mosquito Repellent Actions of the Essential Oils of Cymbopogon citratus, Cymbopogon nardus and Eucalyptus citriodora: Evaluation and Formulation Studies*. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 2012. **15**(5): p. 766-773.
 19. Champakaew, D., et al., *Assessment of Angelica sinensis (Oliv.) Diels as a repellent for personal protection against mosquitoes under laboratory and field conditions in northern Thailand*. Parasit Vectors, 2016. **9**(1): p. 373.
 20. Frances, S.P., et al., *Comparative Field Evaluation of Repellent Formulations Containing Deet and Ir3535 against Mosquitoes in Queensland, Australia*. Journal of the American Mosquito Control Association, 2009. **25**(4): p. 511-513.
 21. Schofield, S., Tepper, M., AND Gadawski, R., *Field Evaluation Against Mosquitoes of Regular and Polymer-Based Deet Formulations in Manitoba, Canada, with Comment on Methodological Issues*. Journal of Medical Entomology, 2007. **44** (3): p. 457-462.
 22. Carroll, S.P. and J. Loye, *PMD, a registered botanical mosquito repellent with deet-like efficacy*. J.Am.Mosq.Control Assoc., 2006. **22**(3): p. 507-514.
 23. Frances, S.P., et al., *Laboratory and field evaluation of commercial repellent formulations against mosquitoes (Diptera : Culicidae) in Queensland, Australia*. Australian Journal of Entomology, 2005. **44**: p. 431-436.
 24. Trongtokit, Y., et al., *Laboratory and field trial of developing medicinal local Thai plant products against four species of mosquito vectors*. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2004. **35**(2): p. 325-33.

25. Tuetun, B., et al., *Repellent properties of celery, Apium graveolens L., compared with commercial repellents, against mosquitoes under laboratory and field conditions.* Trop.Med.Int.Health, 2005. **10**(11): p. 1190-1198.
26. Usavadee Thavara, A.T., Jakkrawarn Chompoosri, Wannapa Suwonkerd,, U.-R.C. Asavadachanukorn, and PREECHA, *Laboratory and Field Evaluations of the Insect Repellent 3535 (Ethylbutylacetylaminopropionate) And DEET against Mosquito Vectors in Thailand.* 2001.
27. Frances, S.P., *Field Evaluation and User Acceptability of Repellent Formulations Containing Deet against Mosquitoes in Australia.* Journal of the American Mosquito Control Association, 2013. **29**(3): p. 289-292.
28. Qualls, W.A., et al., *Field Evaluation of Commercial Repellents Against the Floodwater Mosquito Psorophora columbiae (Diptera: Culicidae) in St. Johns County, Florida.* Journal of Medical Entomology, 2011. **48**(6): p. 1247-1249.
29. Uzzan, B., et al., *Efficacy of four insect repellents against mosquito bites: a double-blind randomized placebo-controlled field study in Senegal.* Fundamental & Clinical Pharmacology, 2009. **23**(5): p. 589-594.
30. Moore, S.J., et al., *Field evaluation of traditionally used plant-based insect repellents and fumigants against the malaria vector Anopheles darlingi in Riberalta, Bolivian Amazon.* Journal of Medical Entomology, 2007. **44**(4): p. 624-630.
31. Frances, S.P., et al., *Field evaluation of repellent formulations containing deet and picaridin against mosquitoes in Northern Territory, Australia.* Journal of Medical Entomology, 2004. **41**(3): p. 414-417.
32. Frances, S.P., et al., *Field evaluation of repellent formulations against daytime and nighttime biting mosquitoes in a tropical rainforest in northern Australia.* Journal of Medical Entomology, 2002. **39**(3): p. 541-544.
33. Barnard, D.R., et al., *Repellency of IR3535, KBR3023, para-menthane-3,8-diol, and deet to black salt marsh mosquitoes (Diptera : Culicidae) in the Everglades National Park.* Journal of Medical Entomology, 2002. **39**(6): p. 895-899.
34. Debboun, M., et al., *Field evaluation of deet and a piperidine repellent against Aedes communis (Diptera : Culicidae) and Simulium venustum (Diptera : Simuliidae) in the Adirondack mountains of new York.* Journal of Medical Entomology, 2000. **37**(6): p. 919-923.
35. Walker, T.W., Robert, L. L., Copeland, R. A., Githeko, A. K., Wirtz, R. A., Githure, J. I. and Klein, T. A., *Field Evaluation of Arthropod Repellents, DEET and a Piperidine Compound, AI3-37220, against Anopheles funestus and Anopheles arabiensis in Western Kenya.* Journal of the American Mosquito Control Association, 1996. **12** (2): p. 172-176.

36. Naucke, T.J., et al., *Field evaluation of the efficacy of proprietary repellent formulations with IR3535((R)) and Picaridin against Aedes aegypti*. Parasitology Research, 2007. **101**(1): p. 169-177.
37. Obermayr, U., A. Rose, and M. Geier, *A Novel Test Cage With an Air Ventilation System as an Alternative to Conventional Cages for the Efficacy Testing of Mosquito Repellents*. Journal of Medical Entomology, 2010. **47**(6): p. 1116-1122.
38. Frances, S.P., et al., *Field evaluation of commercial repellent formulations against mosquitoes (Diptera : Culicidae) in northern territory, Australia*. Journal of the American Mosquito Control Association, 2005. **21**(4): p. 480-482.
39. WHO, *Guidelines for Efficacy Testing of Mosquito Repellents for Human Skin*. 2009, Geneva: World health Organization.
40. EPA, *Product Performance Test Guidelines*. 2010, United States Environmental Protection Agency.
41. Yoon, J.K., et al., *Comparison of Repellency Effect of Mosquito Repellents for DEET, Citronella, and Fennel Oil*. J Parasitol Res, 2015. **2015**: p. 361021.
42. Barnard, D.R., et al., *Mosquito density, biting rate and cage size effects on repellent tests*. Medical and Veterinary Entomology, 1998. **12**(1): p. 39-45.
43. A. A. KHAN, H.I.M., and DEREK L. SKIDMORE, *Insect Repellents: Effect of Mosquito and Repellent-related Factors on Protection Time*. Journal of Economic Entomology, 1976. **Vol. 68, no. 1**.
44. Bissinger, B.W., M.K. Kennedy, and S.P. Carroll, *Sustained efficacy of the novel topical repellent TT-4302 against mosquitoes and ticks*. Med Vet Entomol, 2015.
45. Logan, J.G., *Why do mosquitoes "choose" to bite some people more than others?* Outlooks on Pest Management, 2008.
46. Krockel, U., et al., *New tools for surveillance of adult yellow fever mosquitoes: comparison of trap catches with human landing rates in an urban environment*. J Am Mosq Control Assoc, 2006. **22**(2): p. 229-38.
47. Canyon, D.V. and J.L. Hii, *Efficacy of carbon dioxide, 1-octen-3-ol, and lactic acid in modified Fay-Prince traps as compared to man-landing catch of Aedes aegypti*. J Am Mosq Control Assoc, 1997. **13**(1): p. 66-70.
48. Brugman, V.A., et al., *How often do mosquitoes bite humans in southern England? A standardised summer trial at four sites reveals spatial, temporal and site-related variation in biting rates*. Parasit Vectors, 2017. **10**(1): p. 420.
49. Frances, S.P., et al., *Laboratory and Field Evaluation of Ss220 and Deet Against Mosquitoes in Queensland, Australia*. Journal of the American Mosquito Control Association, 2009. **25**(2): p. 174-178.

50. Suter, T.T., et al., *Surveillance and Control of Aedes albopictus in the Swiss-Italian Border Region: Differences in Egg Densities between Intervention and Non-intervention Areas*. PLoS Negl Trop Dis, 2016. **10**(1): p. e0004315.
51. Colucci, B., Vavassori, L., Suter, T. and Müller, P., *Vorkommen von Stechmücken im Naturwaldreservat Langholz, Kanton Aargau*. 2014.
52. Schaffner, F., et al., *The invasive mosquito Aedes japonicus in Central Europe*. . Medical & Veterinary Entomology, 2009. **23**: p. 448-451.
53. Schaffner F., M.A., *Spatio-temporal diversity of the mosquito fauna (Diptera: Culicidae) in Switzerland*. 2013.
54. Lacey, L.A., *Bacillus thuringiensis serovariety israelensis and Bacillus sphaericus for mosquito control*. J Am Mosq Control Assoc, 2007. **23**(2 Suppl): p. 133-63.
55. Guidi, V., et al., *Distribution of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis in Soil of a Swiss Wetland reserve after 22 years of mosquito control*. Appl Environ Microbiol, 2011. **77**(11): p. 3663-8.
56. MeteoSchweiz, *Klimabulletin Jahr 2015*. 2016: Zürich.
57. Jamrozik, E., et al., *Ethical aspects of malaria control and research*. Malaria Journal, 2015. **14**.
58. Wotodjo, A.N., et al., *No Difference in the Incidence of Malaria in Human-Landing Mosquito Catch Collectors and Non-Collectors in a Senegalese Village with Endemic Malaria*. Plos One, 2015. **10**(5).
59. Govella, N.J., et al., *A new tent trap for sampling exophagic and endophagic members of the Anopheles gambiae complex*. Malar J, 2009. **8**: p. 157.
60. Tangena, J.A.A., et al., *The Human-Baited Double Net Trap: An Alternative to Human Landing Catches for Collecting Outdoor Biting Mosquitoes in Lao PDR*. Plos One, 2015. **10**(9).
61. Maliti, D.V., et al., *Development and evaluation of mosquito-electrocuting traps as alternatives to the human landing catch technique for sampling host-seeking malaria vectors*. Malaria Journal, 2015. **14**.
62. Krajacich, B.J., et al., *Design and Testing of a Novel, Protective Human-Baited Tent Trap for the Collection of Anthropophilic Disease Vectors*. Journal of Medical Entomology, 2014. **51**(1): p. 253-263.
63. Patel, R.V., et al., *EPA-registered repellents for mosquitoes transmitting emerging viral disease*. Pharmacotherapy, 2016.
64. CDC. *Centers for Disease Control and Prevention*. 2016 [cited 2016; Available from: <https://www.cdc.gov/>].

Chapter 7

Appendices



PROBANDEN GESUCHT!

In einer wissenschaftlichen Studie soll der Schutz von Mückenschutzmitteln im Labor und im Feld getestet und verglichen werden.



Mückenschutzmittel sind eine wichtige Hilfe um sich vor schweren Infektionskrankheiten - wie z.B. Malaria oder Denguefieber - die von Mücken übertragen werden, zu schützen. Oftmals werden Mückenschutzmittel aber nur im Labor getestet. Dabei stellt sich die Frage, wie genau die Angaben auf den Produkten bei der Anwendung im Freien wirklich zutreffen.

Ziel dieser Untersuchung ist es, neue Daten über die Schutzdauer von zwei bekannten Wirkstoffen sowohl im Labor wie auch im Feld mit nicht-infizierten Stechmücken in der Schweiz zu liefern und diese miteinander zu vergleichen. Durch diese Studie sollen neue Erkenntnisse gewonnen werden, um Testverfahren für die Entwicklung und Erforschung von Mückenschutzmitteln zu verbessern.

Wir suchen **9 Studentinnen und 9 Studenten**, welche an der Universität Basel immatrikuliert und zwischen 18 und 50 Jahre alt sind. Mit allen Probanden führen wir an insgesamt 10 Tagen Wirksamkeitstests durch. Davon finden **4 Tage im Labor am Swiss TPH** (Basel-Stadt) und **2 x 3 Tage im Feld** (Kantone Aargau und Zürich) statt. Hinzu kommt noch ½ Tag im Labor des Swiss TPH Basel, an welchem die Probanden die Mückenschutzmittel auftragen und das Einfangen von Stechmücken für die Feldversuche üben können. Dies wird in den ersten drei Juli Wochen möglich sein.

Probanden sollten im Feld in Gruppe A, B oder C an 3 Tagen am Stück Zeit haben für die Feldversuche inkl. Reservedaten! Da für die Freilandexperimente nur regenfreie Tage in Frage kommen, müssen wir Reservedaten bereithalten. Die Versuche im Labor können individuell abgesprochen werden.

Gruppe	Feldversuche - Teil 1	Feldversuche - Teil 2	Reservedaten
A	20. - 22.7.2015	17. - 19.8.2015	3. - 12.8.2015 und 27.8 - 5.9.2015
B	23. - 25.7.2015	20. - 22.8.2015	
C	27. - 29.7.2015	24. - 26.8.2015	



Mit der Teilnahme an dieser Studie leisten Sie einen wichtigen Beitrag zur Verbesserung von Testverfahren von Mückenschutzmitteln, welche essentiell für den Schutz von Menschen gegen mückenübertragene Krankheiten sind.

Die Reisekosten zu den Experimenten im Feld sowie die Verpflegung unterwegs wird vom Projekt bezahlt.

Zusätzlich erhalten Sie für die 10½ Tage eine **Aufwandsentschädigung von 1'700 Franken.**

Bei Fragen zum Projekt oder Interesse an einer Teilnahme, melden Sie sich via E-Mail bei:

Frau Barbara Colucci (Doktorandin), barbara.colucci@unibas.ch

Information für die Studienteilnehmer

MOSQUITOREP - Vergleich von Labor- und Feldmethoden zur Messung der Wirkung von Mückenschutzmitteln

Studienleiter:	Dr. Pie Müller
Prüferin:	Frau Barbara Colucci
Projektzentrum:	Schweizerisches Tropen- und Public Health-Institut Socinstrasse 57 Postfach CH-4002 Basel
Finanzierung:	Bundesamt für Gesundheit (BAG)

Version 1.1
Basel, 5. Juni 2015

Sehr geehrte Studienteilnehmerin,

Sehr geehrter Studienteilnehmer

1 Auswahl der Studienteilnehmer

Sie haben sich auf unsere Ausschreibung an der Universität Basel gemeldet, in der wir erwachsene Personen zur Teilnahme an einer Studie von Mückenschutzmitteln gesucht hatten. Sie zeigen keine oder nur milde Reaktionen auf Mückenstiche.

2 Ziel der Studie

Das Ziel dieser Studie ist es, die Wirkungsdauer von zwei verschiedenen Methoden zur Messung der Wirkungsdauer von Mückenschutzmitteln im Labor und im Feld miteinander zu vergleichen. Die daraus gewonnenen Ergebnisse werden uns einen Hinweis darauf geben, wie weit Laborstudien die Wirkung von Mückenschutzmitteln in der Anwendung im Freien voraussagen können.

3 Allgemeine Informationen zur Studie

Das Bundesamt für Gesundheit (BAG) und das Schweizerische Tropen- und Public-Health-Institut (Swiss TPH) sind interessiert, wie gut zwei Methoden zur Messung der Schutzdauer von Mückenschutzmitteln miteinander übereinstimmen. Dazu wird bei 9 Frauen und 9 Männern die Wirkung von zwei Mückenschutzmitteln im Labor und im Feld gemessen und anschliessend miteinander verglichen. In dieser Studie werden die beiden Wirkstoffe N,N-Diethyl-3-methylbenzamid (DEET) und Para-Menthan-3,8-Diol (PMD) verwendet. Beide als Biozide geltenden Wirkstoffe sind in der Schweiz und der EU registriert und dürfen in Mückenschutzmitteln im Handel vertrieben werden. Hier werden diese Wirkstoffe als 15%-ige Formulierungen auf Ethanol Basis zusammen mit einer Kontrolle (nur Ethanol ohne Wirkstoff) getestet.

Sowohl die Labor- wie auch die Feldmethode folgen den Richtlinien für die Prüfung von Mückenschutzmitteln, herausgegeben von der Weltgesundheitsorganisation (WHO. Guidelines for efficacy testing of mosquito repellents for human skin. Geneva: World Health Organization 2009, WHO/HTM/NTD/WHOPES/2009.4.).

4 Freiwilligkeit der Teilnahme

Ihre Teilnahme an dieser Studie ist freiwillig. Sie können Ihre Einwilligung zur Teilnahme an dieser Studie jederzeit zurückziehen, ohne Angabe von Gründen. Im Falle eines Widerrufs werden die bis zu diesem Zeitpunkt erhobenen Daten weiter verwendet.

5 Schutz gegen Malaria und andere Infektionskrankheiten, die durch Stechmücken übertragen werden

Die in den Laborversuchen eingesetzten Stechmücken erhalten vor dem Test kein Blut und werden nach jedem Versuch mit einer Studienteilnehmerin oder einem Studienteilnehmer getötet, um jegliches Risiko potentieller Infektionen auszuschliessen. Zudem wird vor Beginn der Käfigtests Ihre Körpertemperatur mittels eines Fieberthermometers gemessen. Versuchsteilnehmerinnen und Versuchsteilnehmer mit Fieber werden vom Versuch ausgeschlossen.

Das Risiko einer Übertragung von humanpathogenen Erregern durch die einheimischen Stechmücken an den beiden Standorten im Kanton Aargau und Zürich sind als äusserst gering einzuschätzen. Seit dem Verschwinden der Malaria Ende des 19. Jahrhunderts sind in der Schweiz keine Krankheitsfälle bekannt, die durch einheimische Stechmücken übertragen worden wären.

6 Studienablauf

6.1 Feldversuche

Die Feldversuche werden an zwei Standorten (Rothrist, Kanton Aargau und Flaach/Ellikon, Kanton Zürich) durchgeführt.

Die Versuche beginnen jeweils um 16.00 Uhr (auftragen des Mückenschutzmittels vor Ort) und enden um 22.00 Uhr. An- und Abreise sind noch nicht eingerechnet und betragen ca. 1 bis 1.5 Stunden pro Weg ab Basel.

Drei Gruppen A, B und C à 6 Personen werden pro Tag ein Mückenschutzmittel im Feld testen. Jeder Person wird jede der drei Formulierungen einmal im Aargau und einmal in Zürich testen. Die Studie ist „verblindet“, so dass die Teilnehmerinnen und Teilnehmer nicht wissen, welche Formulierung sie an einem bestimmten Tag testen. In der nachstehenden Tabelle sind die Daten aufgeführt, an welchen die Feldversuche stattfinden werden.

Gruppe	Feldversuche - Teil 1	Feldversuche - Teil 2	Reservedaten
A	20. - 22.7.2015	17. - 19.8.2015	3. - 12.8.2015 und 27. - 5.9.2015
B	23. - 25.7.2015	20. - 22.8.2015	
C	27. - 29.7.2015	24. - 26.8.2015	

Da verschiedene Faktoren einen Einfluss auf die Attraktivität für Stechmücken einer Person haben können, sind die Teilnehmerinnen und Teilnehmer angewiesen, Alkohol, Koffein und duftende Kosmetikprodukte (wie z.B. Parfüm, Rasierwasser, Haarspray, Lotionen usw.) 12 Stunden vor und während dem Test zu vermeiden.

Im Versuch wird an einem Tag eine der drei Formulierungen mit 1 ml pro 600 cm² auf einem der beiden Unterschenkel aufgetragen. Dazu wird zuvor die Länge und der Durchmesser des Unterschenkels gemessen, um daraus die Oberfläche zu berechnen. Der restliche Körper ist durch einen Ganzkörperschutzanzug, einem Imkerhelm und Latexhandschuhen vor Mücken-

stichen geschützt. Der Unterschenkel wird zuerst mit geruchsneutraler Seife gewaschen, dann mit Wasser und mit Alkohol abgewischt sowie anschliessend mit einem Tuch getrocknet.

Im Feld gibt es 6 vorgegebene Positionen, an welchen jede Teilnehmerin und jeder Teilnehmer einmal sitzen wird. Diese Positionen sind mind. 20 Meter voneinander entfernt. Eine Stunde nach Auftragen der Testformulierung sammeln die Teilnehmerinnen und Teilnehmer während 30 Minuten alle auf dem Unterschenkel landenden Stechmücken mit Hilfe eines speziellen Saugrohres und überführen diese in dafür vorbereitete Behälter. Danach folgen 30 Minuten Pause, in welcher alle Probanden die Versuchszone verlassen. Dieser Vorgang wird stündlich wiederholt bis zur sechsten Stunde nach Applikation der Formulierung. Die Handhabung des Saugrohres wird im Voraus im Labor des Swiss TPH geübt werden.

6.2 Laborversuche

Die Laborversuche finden alle im Labor des Swiss TPH statt. Insgesamt werden bei jeder Person 6 Tests (2 Formulierungen x 3 Mückenarten) an 4 Tagen nach Vereinbarung in den Monaten August bis November 2015 durchgeführt. Die Studie ist „verblindet“, so dass die Teilnehmerinnen und Teilnehmer nicht wissen, welche Formulierung sie im einzelnen Versuch testen. Die Käfigtests beginnen je nach Mückenart entweder einmal um 9 Uhr und zweimal um 14 Uhr und dauern inkl. Vorbereitung 6 ½ Stunden.

Als Vorbereitung für den Käfigtest wird der Unterarm der Teilnehmerin / des Teilnehmers zuerst mit geruchsneutraler Seife gewaschen, dann mit Wasser und mit Alkohol abgewischt und anschliessend mit einem Tuch getrocknet.

Da verschiedene Faktoren einen Einfluss auf die Attraktivität für Stechmücken einer Person haben können, sind die Teilnehmerinnen und Teilnehmer angewiesen, Alkohol, Koffein und duftende Kosmetikprodukte (wie z.B. Parfüm, Rasierwasser, Haarspray, Lotionen usw.) 12 Stunden vor und während dem Test zu vermeiden.

Als Versuchstiere dienen jeweils 200, 5 bis 10 Tage alte weibliche Stechmücken. Die Tests werden mit drei Arten (*Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* und *Culex quinquefasciatus*) in einem Testkäfig (Abbildung 1a) durchgeführt. Um verlässliche und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, werden sowohl die Mückenzucht wie auch die Verhaltensversuche unter standardisierten Bedingungen durchgeführt. Zucht- und Testbedingungen sind identisch, wobei die Temperatur bei 27 ± 2 °C und die relative Luftfeuchtigkeit bei $70 \pm 5\%$ liegt. Die ausgewachsenen Stechmücken erhalten vor dem Test kein Blut und werden nach jedem Versuch mit einer Studienteilnehmerin oder einem Studienteilnehmer getötet, um potentielle Infektionen auszuschliessen.

Der Unterarm der Studienteilnehmerin oder des Studienteilnehmers wird mit einer Dosis von 1 ml Mückenschutzmittel pro 600 cm^2 sorgfältig behandelt. Dazu wird zuvor die Länge und der Durchmesser des Unterarms gemessen, um daraus die Oberfläche zu berechnen.

Die unbehandelte Hand wird mit einem Handschuh aus Latex geschützt (Abbildung 1b). Es soll ferner Sorge getragen werden, dass die behandelten Flächen während der Versuchszeit nicht übermässig mechanisch belastet werden.

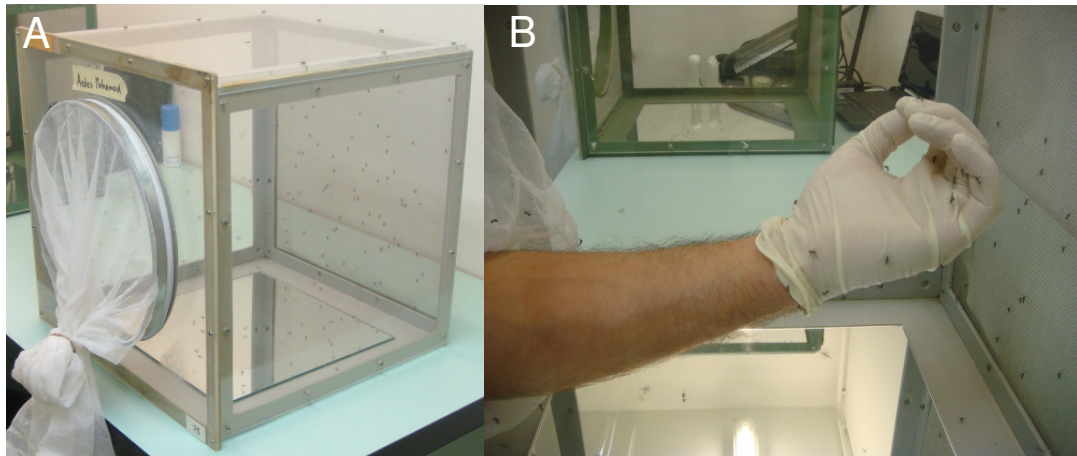


Abbildung 1: Testkäfig. (A) Der Deckel und die beiden Seitenwände des 40 cm x 40 cm x 40 cm grossen Testkäfig bestehen aus Plexiglas. Zusammen mit einem am Boden angebrachten Spiegel lässt sich das Verhalten der Stechmücken leicht beobachten. (B) Ein mit Mückenschutzmittel behandelter Unterarm einer Versuchsperson wird in den Testkäfig gehalten. Während das Mittel die Mücken wirkungsvoll vom Unterarm fernhält, versuchen zahlreiche Mücken durch den Handschuh der unbehandelten Hand zu stechen.

Dreissig Minuten nach der Behandlung halten die Studienteilnehmerinnen und Studienteilnehmer ihren Unterarm während 3 Minuten in den Käfig um die Stechaktivität zu bestimmen (Abbildung 1b). Die Zahl der Mücken, die auf der behandelten Hautfläche landen und stechen werden notiert. Dieser Vorgang wird alle 30 Minuten wiederholt bis zur sechsten Stunde. Landen 10 oder mehr Mücken innerhalb einer 3-minütigen Exposition, so können die Mücken abgeschüttelt werden und der Arm vor Ablauf der 3 Minuten wieder aus dem Käfig gezogen werden.

Zu Beginn des Versuches wird die Stechaktivität der Mücken kontrolliert, indem der unbehandelte Unterarm entweder für 1 Minute oder bis zur zehnten Landung in den Käfig gehalten wird. Dieser Vorgang wird am Ende des Tests wiederholt.

7 Pflichten der Studienteilnehmerinnen und Studienteilnehmer

Als Studienteilnehmerin / Studienteilnehmer sind Sie verpflichtet,

- den Anweisungen der Prüferin zu folgen und sich an den Studienplan zu halten. Insbesondere sind die Teilnehmerinnen und Teilnehmer angewiesen Alkohol, Koffein und duftende Kosmetikprodukte (wie z.B. Parfüm, Rasierwasser, Haarspray, Lotionen usw.) 12 Stunden vor und während dem Test zu vermeiden.
- Die Prüferin oder den Versuchsleiter genau über festgestellte, unerwünschte Wirkungen zu informieren.

8 Nutzen für die Studienteilnehmerinnen und Studienteilnehmer

Bei guter oder weniger guter Schutzwirkung der verwendeten Mückenschutzformulierungen wissen die Studienteilnehmerinnen und Studienteilnehmer für spätere Reisen oder für den

Mückenschutz in der Schweiz allerdings, dass die an ihnen geprüften Wirkstoffe für sie wirksam oder weniger wirksam sind.

Dank Ihrer Studienteilnahme können jedoch die Methoden zur Messung der Wirksamkeit von Mückenschutzmitteln verbessert und Daten aus Laborversuchen sachlicher interpretiert werden. Dies wird den Behörden helfen, zur Registrierung eingereichte Dossiers präziser zu beurteilen und so die Angaben auf der Etiketle für den Konsumenten zu verbessern.

9 Risiken und Unannehmlichkeiten

Auch bei Personen, die nur schwach auf Mückenstiche reagieren, kann der Juckreiz unangenehm sein.

In Ausnahmefällen kann die behandelte Haut durch das Mückenschutzmittel leicht gereizt werden, in sehr seltenen Fällen auch (allergische) Ausschläge auftreten.

10 Vertraulichkeit der Daten

In dieser Studie werden persönliche Daten von Ihnen erfasst. Diese Daten werden anonymisiert. Sie sind nur Fachleuten zur wissenschaftlichen Auswertung zugänglich.

Ebenso kann die zuständige Ethikkommission Nordwest- und Zentralschweiz und Zürich Einsicht in die Originaldaten nehmen. Während der ganzen Studie und bei den erwähnten Kontrollen wird die Vertraulichkeit strikt gewahrt. Ihr Name wird in keiner Weise in Rapporten oder Publikationen, die aus der Studie hervorgehen, veröffentlicht.

11 Kosten

Die in dieser Probandeninformation erwähnten Untersuchungen sind kostenlos.

12 Entschädigung für die Studienteilnehmerinnen und Studienteilnehmer

Für die Teilnahme an der Studie erhalten Sie eine pauschale Entschädigung von CHF 1'700.

Damit Ihnen der Betrag ausbezahlt werden kann, muss einerseits eine Arbeitsbewilligung in der Schweiz vorliegen und andererseits das Stammdatenblatt, welches Ihnen mit dieser Information für die Studienteilnehmer abgegeben wurde, zusammen mit der Einverständniserklärung vor Versuchsbeginn ausgefüllt und unterschrieben der Prüferin abgegeben werden.

13 Unfreiwilliger Studienabbruch

Ihre Teilnahme kann durch den Studienleiter abgebrochen werden, insbesondere bei allergischen Reaktionen auf Mückenstiche und Fieber oder bei Missachtung der Vorgaben des Studienleiters.

Bei allergischen Reaktionen ist zu Ihrer Sicherheit eine medizinische Abschlussuntersuchung notwendig. Diese Untersuchungen sind für Sie kostenlos.

14 Deckung von Schäden

Swiss TPH ersetzt Ihnen Schäden, die Sie gegebenenfalls im Rahmen der Studie erleiden.

Zu diesem Zweck hat Swiss TPH zu Ihren Gunsten eine Haftpflichtversicherung bei AXA Versicherungen AG (Police-Nr. 4.746.321) abgeschlossen.

Stellen Sie während oder nach dem Versuch gesundheitliche Probleme oder andere Schäden fest, so wenden Sie sich bitte entweder an die Prüferin (Frau Barbara Colucci) an den Versuchsleiter (Dr. Pie Müller). Er wird für Sie die notwendigen Schritte einleiten.

15 Kontaktperson(en)

Bei Unklarheiten, Notfällen, unerwarteten oder unerwünschten Ereignissen, die während der Studie oder nach deren Abschluss auftreten, können Sie sich jederzeit an die nachfolgend aufgelistete Kontaktperson(en) wenden.

Prüferin:	Frau Barbara Colucci Tel. 061 284 86 12 (intern 8612) barbara.colucci@unibas.ch
-----------	---

Studienleiter:	Dr. Pie Müller Tel. 061 284 82 41 (intern 8241) pie.mueller@unibas.ch
----------------	---

24h Notfallnummer:	144 (intern) 061 284 81 44 (extern)
--------------------	--



Schriftliche Einverständniserklärung zur Studienteilnahme

Bitte lesen Sie dieses Formular sorgfältig durch.

Bitte fragen Sie, wenn Sie etwas nicht verstehen oder wissen möchten.

Nummer der Studie	MOSQUITOREP
Titel der Studie	Vergleich von Methoden zur Messung der Wirkungsdauer von Mückenschutzmitteln
Finanzierung	Bundesamt für Gesundheit BAG
Studienorte	Kantone Basel-Stadt, Aargau und Zürich
Studienleiter	Dr. Pie Müller
Teilnehmerin/Teilnehmer	<p>Vorname:</p> <p>Name:</p> <p>Geburtsdatum:</p> <p>Geschlecht: <input type="checkbox"/> weiblich <input type="checkbox"/> männlich</p>

Ich wurde vom unterzeichnenden Prüfer mündlich und schriftlich über die Ziele, den Ablauf der Studie, über die zu erwartenden Wirkungen, über mögliche Vor- und Nachteile sowie über eventuelle Risiken informiert.

Ich habe die zur oben genannten Studie schriftliche Teilnehmerinformation gelesen und verstanden. Meine Fragen im Zusammenhang mit der Teilnahme an dieser Studie sind mir zufriedenstellend beantwortet worden. Ich kann die schriftliche Teilnehmerinformation behalten und erhalte eine Kopie meiner schriftlichen Einverständniserklärung.

Ich hatte genügend Zeit, um meine Entscheidung zu treffen.

Ich bin darüber informiert, dass eine Versicherung Schäden deckt, falls solche im Rahmen der Studie auftreten.

Ich weiss, dass meine persönlichen Daten nur in anonymisierter Form an aussenstehende Institutionen weitergegeben werden. Ich bin einverstanden, dass die zuständigen Fachleute des Studienauftraggebers und der Kantonalen Ethikkommission zu Prüf- und Kontrollzwecken in meine Originaldaten Einsicht nehmen dürfen, jedoch unter strikter Einhaltung der Vertraulichkeit.

Ich nehme an dieser Studie freiwillig teil. Ich kann jederzeit und ohne Angabe von Gründen meine Zustimmung zur Teilnahme widerrufen. In diesem Fall kann ich auf eigenen Wunsch zu meiner Sicherheit vom medizinischen Team des Swiss TPH abschliessend medizinisch untersucht werden.

Ich bin mir bewusst, dass während der Studie die in der Teilnehmerinformation genannten Anforderungen und Einschränkungen einzuhalten sind.

Im Interesse meiner Gesundheit kann mich der Versuchsleiter jederzeit von der Studie ausschliessen. Zudem orientiere ich den Versuchsleiter über die Behandlung bei einem anderen Arzt sowie über die Einnahme von Medikamenten (vom Arzt verordnete oder selbständig gekaufte).

Ort, Datum	Unterschrift der Teilnehmerin / des Teilnehmers
------------	---

Bestätigung des Versuchsleiters: Hiermit bestätige ich, dass ich dieser Teilnehmerin / diesem Teilnehmer Wesen, Bedeutung und Tragweite der Studie erläutert habe. Ich versichere, alle im Zusammenhang mit dieser Studie stehenden Verpflichtungen zu erfüllen. Sollte ich zu irgendeinem Zeitpunkt während der Durchführung der Studie von Aspekten erfahren, welche die Bereitschaft der Probandin / des Probanden zur Teilnahme an der Studie beeinflussen könnten, werde ich sie/ihn umgehend darüber informieren.

Ort, Datum	Unterschrift des Studienleiters
------------	---------------------------------

Datenblatt Feldversuch MOSQUITOREP

Testperson: S.1 Datum Experiment:

Datum Einverständnis:

Extremität: ☐ linker Unterschenkel Testfläche [cm²]:

☐ rechter Unterschenkel Testfläche [cm²]:

Testpräparat: Körpertemperatur [°C]:

Applizierte Menge: Zeit der Applikation:

Ortschaft in der Schweiz: ☐ Rothrist, Aargau ☐ Ellikon am Rhein, Zürich

Die Expositionsdauer ist jeweils 30 Minuten.

Zeit nach der Applikation	Position	Anzahl landende Mücken	Sekunden bis zur 1. Landung	Sekunden bis zur 2. Landung	Anzahl entwischte Mücken	Anzahl gefangene Mücken	Anzahl Stiche
1 h	1						
2 h	6						
3 h	2						
4 h	5						
5 h	3						
6 h	4						

Bemerkungen:

Unterschrift Prüferin:

Datenblatt Feldversuch MOSQUITOREP

Testperson: S.2..... Datum Experiment:

Datum Einverständnis:

Extremität: ☐ linker Unterschenkel Testfläche [cm²):.....

☐ rechter Unterschenkel Testfläche [cm²):.....

Testpräparat: Körpertemperatur [°C]:

Applizierte Menge: Zeit der Applikation:

Ortschaft in der Schweiz: ☐ Rothrist, Aargau ☐ Ellikon am Rhein, Zürich

Die Expositionsdauer ist jeweils 30 Minuten.

Zeit nach der Applikation	Position	Anzahl landende Mücken	Sekunden bis zur 1. Landung	Sekunden bis zur 2. Landung	Anzahl entwischte Mücken	Anzahl gefangene Mücken	Anzahl Stiche
1 h	2						
2 h	1						
3 h	3						
4 h	6						
5 h	4						
6 h	5						

Bemerkungen:

Unterschrift Prüferin:

Datenblatt Feldversuch MOSQUITOREP

Testperson: S.3..... Datum Experiment:

Datum Einverständnis:

Extremität: ☐ linker Unterschenkel Testfläche [cm²):.....

☐ rechter Unterschenkel Testfläche [cm²):.....

Testpräparat: Körpertemperatur [°C]:

Applizierte Menge: Zeit der Applikation:

Ortschaft in der Schweiz: ☐ Rothrist, Aargau ☐ Ellikon am Rhein, Zürich

Die Expositionsdauer ist jeweils 30 Minuten.

Zeit nach der Applikation	Position	Anzahl landende Mücken	Sekunden bis zur 1. Landung	Sekunden bis zur 2. Landung	Anzahl entwischte Mücken	Anzahl gefangene Mücken	Anzahl Stiche
1 h	3						
2 h	2						
3 h	4						
4 h	1						
5 h	5						
6 h	6						

Bemerkungen:

Unterschrift Prüferin:

Datenblatt Feldversuch MOSQUITOREP

Testperson: S.4..... Datum Experiment:

Datum Einverständnis:

Extremität: ☐ linker Unterschenkel Testfläche [cm²):.....

☐ rechter Unterschenkel Testfläche [cm²):.....

Testpräparat:..... Körpertemperatur [°C]:.....

Applizierte Menge:..... Zeit der Applikation:

Ortschaft in der Schweiz: ☐ Rothrist, Aargau ☐ Ellikon am Rhein, Zürich

Die Expositionsdauer ist jeweils 30 Minuten.

Zeit nach der Applikation	Position	Anzahl landende Mücken	Sekunden bis zur 1. Landung	Sekunden bis zur 2. Landung	Anzahl entwischte Mücken	Anzahl gefangene Mücken	Anzahl Stiche
1 h	4						
2 h	3						
3 h	5						
4 h	2						
5 h	6						
6 h	1						

Bemerkungen:

Unterschrift Prüferin:.....

Datenblatt Feldversuch MOSQUITOREP

Testperson: S.5..... Datum Experiment:

Datum Einverständnis:

Extremität: ☐ linker Unterschenkel Testfläche [cm²):.....

☐ rechter Unterschenkel Testfläche [cm²):.....

Testpräparat:..... Körpertemperatur [°C]:.....

Applizierte Menge:..... Zeit der Applikation:

Ortschaft in der Schweiz: ☐ Rothrist, Aargau ☐ Ellikon am Rhein, Zürich

Die Expositionsdauer ist jeweils 30 Minuten.

Zeit nach der Applikation	Position	Anzahl landende Mücken	Sekunden bis zur 1. Landung	Sekunden bis zur 2. Landung	Anzahl entwischte Mücken	Anzahl gefangene Mücken	Anzahl Stiche
1 h	5						
2 h	4						
3 h	6						
4 h	3						
5 h	1						
6 h	2						

Bemerkungen:

Unterschrift Prüferin:.....

Datenblatt Feldversuch MOSQUITOREP

Testperson: S.6..... Datum Experiment:

Datum Einverständnis:

Extremität: ☐ linker Unterschenkel Testfläche [cm²):.....

☐ rechter Unterschenkel Testfläche [cm²):.....

Testpräparat:..... Körpertemperatur [°C]:.....

Applizierte Menge:..... Zeit der Applikation:

Ortschaft in der Schweiz: ☐ Rothrist, Aargau ☐ Ellikon am Rhein, Zürich

Die Expositionsdauer ist jeweils 30 Minuten.

Zeit nach der Applikation	Position	Anzahl landende Mücken	Sekunden bis zur 1. Landung	Sekunden bis zur 2. Landung	Anzahl entwischte Mücken	Anzahl gefangene Mücken	Anzahl Stiche
1 h	6						
2 h	5						
3 h	1						
4 h	4						
5 h	2						
6 h	3						

Bemerkungen:

Unterschrift Prüferin:.....

Datenblatt Laborversuch MOSQUITOREP

Testperson:..... Datum:

Datum Einverständnis:.....

Extremität: ☐ linker Unterarm Testfläche [cm²):.....

☐ rechter Unterarm Testfläche [cm²):.....

Testpräparat: Körpertemperatur [°C]:

Applizierte Menge:..... Zeit der Applikation:.....

Mückenart: ☐ *Ae. aegypti* ☐ *An. stephensi* ☐ *Cx. quinquefasciatus*

Kontrolle vor Testbeginn:

☐ Zeit in Sekunden, bis 10 Stechmücken gelandet sind:.....

☐ Anzahl Mücken, welche innerhalb von 60 Sekunden gelandet sind:

Zeit nach der Applikation	Expositionsdauer	Sekunden bis zur 1. Landung	Sekunden bis zur 2. Landung	Anzahl Landungen	Anzahl Stiche
0.5 h	<input type="checkbox"/> 3 Min. <input type="checkbox"/> Sekunden bis zur 10. Landung				
1 h	<input type="checkbox"/> 3 Min. <input type="checkbox"/> Sekunden bis zur 10. Landung				
1.5 h	<input type="checkbox"/> 3 Min. <input type="checkbox"/> Sekunden bis zur 10. Landung				
2 h	<input type="checkbox"/> 3 Min. <input type="checkbox"/> Sekunden bis zur 10. Landung				
2.5 h	<input type="checkbox"/> 3 Min. <input type="checkbox"/> Sekunden bis zur 10. Landung				
3 h	<input type="checkbox"/> 3 Min. <input type="checkbox"/> Sekunden bis zur 10. Landung				
3.5 h	<input type="checkbox"/> 3 Min. <input type="checkbox"/> Sekunden bis zur 10. Landung				
4 h	<input type="checkbox"/> 3 Min. <input type="checkbox"/> Sekunden bis zur 10. Landung				
4.5 h	<input type="checkbox"/> 3 Min. <input type="checkbox"/> Sekunden bis zur 10. Landung				
5 h	<input type="checkbox"/> 3 Min. <input type="checkbox"/> Sekunden bis zur 10. Landung				
5.5 h	<input type="checkbox"/> 3 Min. <input type="checkbox"/> Sekunden bis zur 10. Landung				
6 h	<input type="checkbox"/> 3 Min. <input type="checkbox"/> Sekunden bis zur 10. Landung				

Kontrolle nach dem Test:

☐ Zeit in Sekunden, bis 10 Stechmücken gelandet sind:.....

☐ Anzahl Mücken, welche innerhalb von 60 Sekunden gelandet sind:

Bemerkungen:

Unterschrift Prüferin:

Schriftliche Einverständniserklärung zur Studienteilnahme

Bitte lesen Sie dieses Formular sorgfältig durch.

Bitte fragen Sie, wenn Sie etwas nicht verstehen oder wissen möchten.

Nummer der Studie	ALETHEIA 2016
Titel der Studie	Messung der Wirkungsdauer von Mückenschutzmitteln
Sponsor	Swiss Tropical and Public Health Institut
Studienort	Swiss Tropical and Public Health Institut, Kanton Basel-Stadt
Studienleiter	Dr. Pie Müller
Prüferin	Barbara Colucci
Teilnehmerin/Teilnehmer	Vorname: Name: Geburtsdatum: Geschlecht: <input type="checkbox"/> weiblich <input type="checkbox"/> männlich

Ich wurde vom unterzeichnenden Prüfer mündlich und schriftlich über die Ziele, den Ablauf der Studie, über die zu erwartenden Wirkungen, über mögliche Vor- und Nachteile sowie über eventuelle Risiken informiert.

Ich habe die zur oben genannten Studie schriftlichen Teilnehmerinformation gelesen und verstanden. Meine Fragen im Zusammenhang mit der Teilnahme an dieser Studie sind mir zufriedenstellend beantwortet worden. Ich kann die schriftliche Teilnehmerinformation behalten und erhalte eine Kopie meiner schriftlichen Einverständniserklärung.

Ich hatte genügend Zeit, um meine Entscheidung zu treffen.

Ich bin darüber informiert, dass eine Versicherung Schäden deckt, falls solche im Rahmen der Studie auftreten.

Ich weiss, dass meine persönlichen Daten nur in anonymisierter Form an aussen stehende Institutionen weitergegeben werden. Ich bin einverstanden, dass die zuständigen Fachleute des Studienauftraggebers und der Kantonalen Ethikkommission zu Prüf- und Kontrollzwecken in meine Originaldaten Einsicht nehmen dürfen, jedoch unter strikter Einhaltung der Vertraulichkeit.

Ich nehme an dieser Studie freiwillig teil. Ich kann jederzeit und ohne Angabe von Gründen meine Zustimmung zur Teilnahme widerrufen. In diesem Fall kann ich auf eigenen Wunsch und zu meiner Sicherheit vom medizinischen Team des Swiss TPH abschliessend medizinisch untersucht werden.

Ich bin mir bewusst, dass die in der Teilnehmerinformation genannten Anforderungen und Einschränkungen während der Studie einzuhalten sind.

Im Interesse meiner Gesundheit kann mich der Versuchsleiter jederzeit von der Studie ausschliessen. Zudem orientiere ich den Versuchsleiter über die Behandlung bei einem anderen Arzt sowie über die Einnahme von Medikamenten (vom Arzt verordnete oder selbständig gekaufte).

Ort, Datum	Unterschrift der Teilnehmerin / des Teilnehmers
------------	---

Bestätigung des Versuchsleiters: Hiermit bestätige ich, dass ich dieser Teilnehmerin / diesem Teilnehmer Wesen, Bedeutung und Tragweite der Studie erläutert habe. Ich versichere, alle im Zusammenhang mit dieser Studie stehenden Verpflichtungen zu erfüllen. Sollte ich zu irgendeinem Zeitpunkt während der Durchführung der Studie von Aspekten erfahren, welche die Bereitschaft der Probandin/des Probanden zur Teilnahme an der Studie beeinflussen könnten, werde ich sie/ihn umgehend darüber informieren.

Ort, Datum	Unterschrift des Versuchsleiters/der Prüferin
------------	---

ALETHEIA 2016: Datenblatt Laborversuch «OHNE LÜFTUNG»

Testperson:..... Datum:

Datum Einverständnis:.....

Extremität: ☐ linker Unterarm Testfläche [cm²):.....

☐ rechter Unterarm Testfläche [cm²):.....

Testpräparat: Körpertemperatur [°C]:

Applizierte Menge:..... Zeit der Applikation:.....

Mückenart: ☐ *Ae. aegypti* ☐ *An. stephensi* ☐ *Cx. quinquefasciatus*

Kontrolle vor Testbeginn:

☐ Zeit in Sekunden, bis 10 Stechmücken gelandet sind:.....

☐ Anzahl Mücken, welche innerhalb von 60 Sekunden gelandet sind:

Zeit nach der Applikation	Expositionsdauer	Sekunden bis zur 1. Landung	Sekunden bis zur 2. Landung	Anzahl Landungen	Anzahl Stiche
0.5 h	<input type="checkbox"/> 3 Min. <input type="checkbox"/> Sek. bis 10. Landung <input type="checkbox"/> 2 Min. vor geschl. Lüftung				
1 h	<input type="checkbox"/> 3 Min. <input type="checkbox"/> Sek. bis 10. Landung <input type="checkbox"/> 2 Min. vor geschl. Lüftung				
1.5 h	<input type="checkbox"/> 3 Min. <input type="checkbox"/> Sek. bis 10. Landung <input type="checkbox"/> 2 Min. vor geschl. Lüftung				
2 h	<input type="checkbox"/> 3 Min. <input type="checkbox"/> Sek. bis 10. Landung <input type="checkbox"/> 2 Min. vor geschl. Lüftung				
2.5 h	<input type="checkbox"/> 3 Min. <input type="checkbox"/> Sek. bis 10. Landung <input type="checkbox"/> 2 Min. vor geschl. Lüftung				
3 h	<input type="checkbox"/> 3 Min. <input type="checkbox"/> Sek. bis 10. Landung <input type="checkbox"/> 2 Min. vor geschl. Lüftung				
3.5 h	<input type="checkbox"/> 3 Min. <input type="checkbox"/> Sek. bis 10. Landung <input type="checkbox"/> 2 Min. vor geschl. Lüftung				
4 h	<input type="checkbox"/> 3 Min. <input type="checkbox"/> Sek. bis 10. Landung <input type="checkbox"/> 2 Min. vor geschl. Lüftung				
4.5 h	<input type="checkbox"/> 3 Min. <input type="checkbox"/> Sek. bis 10. Landung <input type="checkbox"/> 2 Min. vor geschl. Lüftung				
5 h	<input type="checkbox"/> 3 Min. <input type="checkbox"/> Sek. bis 10. Landung <input type="checkbox"/> 2 Min. vor geschl. Lüftung				
5.5 h	<input type="checkbox"/> 3 Min. <input type="checkbox"/> Sek. bis 10. Landung <input type="checkbox"/> 2 Min. vor geschl. Lüftung				
6 h	<input type="checkbox"/> 3 Min. <input type="checkbox"/> Sek. bis 10. Landung <input type="checkbox"/> 2 Min. vor geschl. Lüftung				

Kontrolle nach dem Test:

☐ Zeit in Sekunden, bis 10 Stechmücken gelandet sind:.....

☐ Anzahl Mücken, welche innerhalb von 60 Sekunden gelandet sind:

Bemerkungen:

Unterschrift Prüferin:

ALETHEIA 2016: Datenblatt Laborversuch «MIT LÜFTUNG»

Testperson:..... Datum:

Datum Einverständnis:.....

Extremität: ☐ linker Unterarm Testfläche [cm²):.....

☐ rechter Unterarm Testfläche [cm²):.....

Testpräparat: Körpertemperatur [°C]:

Applizierte Menge:..... Zeit der Applikation:.....

Mückenart: ☐ *Ae. aegypti* ☐ *An. stephensi* ☐ *Cx. quinquefasciatus*

Kontrolle vor Testbeginn:

☐ Zeit in Sekunden, bis 10 Stechmücken gelandet sind:.....

☐ Anzahl Mücken, welche innerhalb von 60 Sekunden gelandet sind:

Zeit nach der Applikation	Expositionsdauer	Sekunden bis zur 1. Landung	Sekunden bis zur 2. Landung	Anzahl Landungen	Anzahl Stiche
0.5 h	<input type="checkbox"/> 3 Min. <input type="checkbox"/> Sek. bis 10. Landung <input type="checkbox"/> 2 Min. vor offene Lüftung				
1 h	<input type="checkbox"/> 3 Min. <input type="checkbox"/> Sek. bis 10. Landung <input type="checkbox"/> 2 Min. vor offene Lüftung				
1.5 h	<input type="checkbox"/> 3 Min. <input type="checkbox"/> Sek. bis 10. Landung <input type="checkbox"/> 2 Min. vor offene Lüftung				
2 h	<input type="checkbox"/> 3 Min. <input type="checkbox"/> Sek. bis 10. Landung <input type="checkbox"/> 2 Min. vor offene Lüftung				
2.5 h	<input type="checkbox"/> 3 Min. <input type="checkbox"/> Sek. bis 10. Landung <input type="checkbox"/> 2 Min. vor offene Lüftung				
3 h	<input type="checkbox"/> 3 Min. <input type="checkbox"/> Sek. bis 10. Landung <input type="checkbox"/> 2 Min. vor offene Lüftung				
3.5 h	<input type="checkbox"/> 3 Min. <input type="checkbox"/> Sek. bis 10. Landung <input type="checkbox"/> 2 Min. vor offene Lüftung				
4 h	<input type="checkbox"/> 3 Min. <input type="checkbox"/> Sek. bis 10. Landung <input type="checkbox"/> 2 Min. vor offene Lüftung				
4.5 h	<input type="checkbox"/> 3 Min. <input type="checkbox"/> Sek. bis 10. Landung <input type="checkbox"/> 2 Min. vor offene Lüftung				
5 h	<input type="checkbox"/> 3 Min. <input type="checkbox"/> Sek. bis 10. Landung <input type="checkbox"/> 2 Min. vor offene Lüftung				
5.5 h	<input type="checkbox"/> 3 Min. <input type="checkbox"/> Sek. bis 10. Landung <input type="checkbox"/> 2 Min. vor offene Lüftung				
6 h	<input type="checkbox"/> 3 Min. <input type="checkbox"/> Sek. bis 10. Landung <input type="checkbox"/> 2 Min. vor offene Lüftung				

Kontrolle nach dem Test:

☐ Zeit in Sekunden, bis 10 Stechmücken gelandet sind:.....

☐ Anzahl Mücken, welche innerhalb von 60 Sekunden gelandet sind:

Bemerkungen:

Unterschrift Prüferin:

Information für die Studienteilnehmer

ALETHEIA - Laborexperimente zur Messung der Wirkung von Mückenschutzmitteln

Studienleiter:	Dr. Pie Müller
Prüferin:	Frau Barbara Colucci
Projektzentrum:	Schweizerisches Tropen- und Public Health-Institut Socinstrasse 57 Postfach CH-4002 Basel
Finanzierung:	Schweizerisches Tropen- und Public Health-Institut

Basel, 7. Mai 2016

Sehr geehrte Studienteilnehmerin,

Sehr geehrter Studienteilnehmer

1 Auswahl der Studienteilnehmer

Sie haben sich auf unsere Ausschreibung an der Universität Basel gemeldet, in der wir erwachsene Personen zur Teilnahme an einer Studie von Mückenschutzmitteln gesucht hatten. Sie zeigen keine oder nur milde Reaktionen auf Mückenstiche.

2 Ziel der Studie

Das Ziel dieser Studie ist es, die Wirkungsdauer von zwei Mückenschutzmitteln in Laborexperimenten zu prüfen. Dabei werden zwei bekannte Wirkstoffe in einer Konzentration von 30% getestet. Die Experimente werden mit und ohne Lüftung der Mückenkäfige nach der Exposition durchgeführt. Die daraus gewonnenen Ergebnisse werden uns einen Hinweis darauf geben, wie stark der Einfluss der sich im Käfig anreichenden Duftstoffe ist und wie sehr sich dieser auf das Verhalten der Stechmücken auswirkt.

3 Allgemeine Informationen zur Studie

Das Schweizerische Tropen- und Public-Health-Institut (Swiss TPH) ist daran interessiert, wie gut die Methoden zur Messung der Schutzdauer von Mückenschutzmitteln funktionieren. Dazu wird bei 10 Probanden die Wirkung von zwei Mückenschutzmitteln im Labor gemessen und anschliessend miteinander verglichen. In dieser Studie werden die beiden Wirkstoffe N,N-Diethyl-3-methylbenzamid (DEET) und Para-Menthan-3,8-Diol (PMD) verwendet und in Formulierungen von 30% auf Ethanol Basis aufgetragen. Beide als Biozide geltende Wirkstoffe sind in der Schweiz und der EU registriert und dürfen in Mückenschutzmitteln im Handel vertrieben werden.

Die Laborexperimente folgen den Richtlinien für die Prüfung von Mückenschutzmitteln, herausgegeben von der Weltgesundheitsorganisation (WHO. Guidelines for efficacy testing of mosquito repellents for human skin. Geneva: World Health Organization 2009, WHO/HTM/NTD/WHOPES/2009.4.).

4 Freiwilligkeit der Teilnahme

Ihre Teilnahme an dieser Studie ist freiwillig. Sie können Ihre Einwilligung zur Teilnahme an dieser Studie jederzeit zurückziehen, ohne Angabe von Gründen. Im Falle eines Widerrufs werden die bis zu diesem Zeitpunkt erhobenen Daten weiter verwendet.

5 Schutz gegen Malaria und andere Infektionskrankheiten, die durch Stechmücken übertragen werden

Die in den Laborversuchen eingesetzten Stechmücken erhalten vor dem Test kein Blut und werden nach jedem Versuch mit einer Studienteilnehmerin oder einem Studienteilnehmer getötet, um jegliches Risiko potentieller Infektionen auszuschliessen. Zudem wird vor Beginn der Käfigtests Ihre Körpertemperatur mittels eines Fieberthermometers gemessen. Versuchsteilnehmerinnen und Versuchsteilnehmer mit Fieber werden vom Versuch ausgeschlossen.

6 Studienablauf

Die Laborversuche finden alle im Labor des Swiss TPH statt. Insgesamt werden bei jeder Person 4 Tests (2 Formulierungen x 2 Mückenarten) an 4 Tagen nach Vereinbarung in den Monaten Mai bis August 2016 durchgeführt. Die Studie ist „verblindet“, so dass die Teilnehmerinnen und Teilnehmer nicht wissen, welche Formulierung sie im einzelnen Versuch testen. Die Käfigtests beginnen je nach Mückenart entweder um 9 Uhr oder um 14 Uhr und dauern inkl. Vorbereitung 6 ½ Stunden.

Als Vorbereitung für den Käfigtest wird der Unterarm der Teilnehmerin / des Teilnehmers zuerst mit geruchsneutraler Seife gewaschen, dann mit Wasser und mit Alkohol abgewischt und anschliessend mit einem Tuch getrocknet.

Da verschiedene Faktoren einen Einfluss auf die Attraktivität für Stechmücken einer Person haben können, sind die Teilnehmerinnen und Teilnehmer angewiesen, Alkohol, Koffein und duftende Kosmetikprodukte (wie z.B. Parfüm, Rasierwasser, Haarspray, Lotionen usw.) 12 Stunden vor und während dem Test zu vermeiden.

Als Versuchstiere dienen jeweils 200, 5 bis 10 Tage alte weibliche Stechmücken. Die Tests werden mit zwei Arten (*Aedes aegypti* und *Anopheles stephensi*) in einem Testkäfig (Abbildung 1A) durchgeführt. Um verlässliche und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, werden sowohl die Mückenzucht wie auch die Experimente im Testraum unter standardisierten Bedingungen durchgeführt. Es herrscht eine Temperatur von 27 ± 2 °C und die relative Luftfeuchtigkeit bei $70\pm 5\%$. Die ausgewachsenen Stechmücken erhalten vor dem Test kein Blut und werden nach jedem Experiment mit einer Studienteilnehmerin oder einem Studienteilnehmer getötet, um potentielle Infektionen auszuschliessen.

Der Unterarm der Studienteilnehmerin oder des Studienteilnehmers wird mit einer Dosis von 1 ml Mückenschutzmittel pro 600 cm^2 sorgfältig behandelt. Dazu wird zuvor die Länge und der Durchmesser des Unterarms gemessen, um daraus die Oberfläche zu berechnen.

Die unbehandelte Hand wird mit einem Handschuh aus Latex geschützt (Abbildung 1B). Es soll ferner Sorge getragen werden, dass die behandelten Flächen während der Versuchszeit nicht übermässig mechanisch belastet werden.

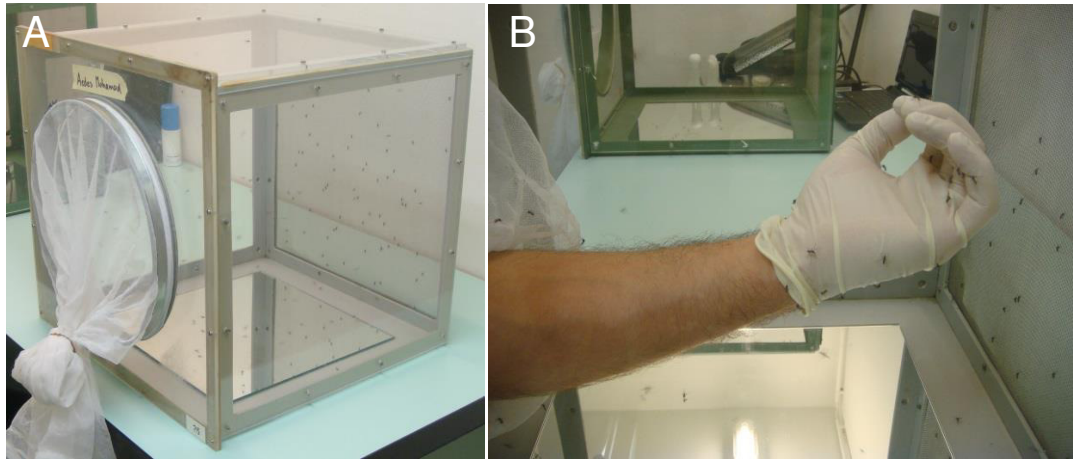


Abbildung 1: Testkäfig. (A) Der Deckel und die beiden Seitenwände des 40 cm x 40 cm x 40 cm grossen Testkäfig bestehen aus Plexiglas. Zusammen mit einem am Boden angebrachten Spiegel lässt sich das Verhalten der Stechmücken leicht beobachten. (B) Ein mit Mückenschutzmittel behandelter Unterarm einer Versuchsperson wird in den Testkäfig gehalten. Während das Mittel die Mücken wirkungsvoll vom Unterarm fernhält, versuchen zahlreiche Mücken durch den Handschuh der unbehandelten Hand zu stechen.

Dreissig Minuten nach der Behandlung mit dem Mückenschutzmittel halten die Studienteilnehmerinnen und Studienteilnehmer ihren Unterarm während 3 Minuten in den Käfig um die Stechaktivität zu bestimmen (Abbildung 1B). Die Zahl der Mücken, die auf der behandelten Hautfläche landen und stechen werden notiert. Dieser Vorgang wird alle 30 Minuten wiederholt bis zur sechsten Stunde. Landen 10 oder mehr Mücken innerhalb einer 3-minütigen Exposition, so können die Mücken abgeschüttelt werden und der Arm vor Ablauf der 3 Minuten wieder aus dem Käfig gezogen werden.

Zu Beginn des Versuches wird die Stechaktivität der Mücken kontrolliert, indem der unbehandelte Unterarm entweder für 1 Minute oder bis zur zehnten Landung in den Käfig gehalten wird. Dieser Vorgang wird am Ende des Tests wiederholt.

7 Pflichten der Studienteilnehmerinnen und Studienteilnehmer

Als Studienteilnehmerin / Studienteilnehmer sind Sie verpflichtet,

- den Anweisungen der Prüferin zu folgen und sich an den Studienplan zu halten. Insbesondere sind die Teilnehmerinnen und Teilnehmer angewiesen Alkohol, Koffein und duftende Kosmetikprodukte (wie z.B. Parfüm, Rasierwasser, Haarspray, Lotionen usw.) 12 Stunden vor und während dem Test zu vermeiden.
- Die Prüferin oder den Versuchsleiter genau über festgestellte, unerwünschte Wirkungen zu informieren.

8 Nutzen für die Studienteilnehmerinnen und Studienteilnehmer

Bei guter oder weniger guter Schutzwirkung der verwendeten Mückenschutzformulierungen wissen die Studienteilnehmerinnen und Studienteilnehmer für spätere Reisen oder für den Mückenschutz in der Schweiz allerdings, dass die an ihnen geprüften Wirkstoffe für sie wirksam oder weniger wirksam sind.

Dank Ihrer Studienteilnahme können die Methoden zur Messung der Wirksamkeit von Mückenschutzmitteln verbessert und Daten aus Laborversuchen sachlicher interpretiert werden.

9 Risiken und Unannehmlichkeiten

Auch bei Personen, die nur schwach auf Mückenstiche reagieren, kann der Juckreiz unangenehm sein.

In Ausnahmefällen kann die behandelte Haut durch das Mückenschutzmittel leicht gereizt werden, in sehr seltenen Fällen auch (allergische) Ausschläge auftreten.

10 Vertraulichkeit der Daten

In dieser Studie werden persönliche Daten von Ihnen erfasst. Diese Daten werden anonymisiert. Sie sind nur Fachleuten zur wissenschaftlichen Auswertung zugänglich.

Ebenso kann die zuständige Ethikkommission Nordwest- und Zentralschweiz Einsicht in die Originaldaten nehmen. Während der ganzen Studie und bei den erwähnten Kontrollen wird die Vertraulichkeit strikt gewahrt. Ihr Name wird in keiner Weise in Rapporten oder Publikationen, die aus der Studie hervorgehen, veröffentlicht.

11 Kosten

Die in dieser Probandeninformation erwähnten Untersuchungen sind kostenlos.

12 Entschädigung für die Studienteilnehmerinnen und Studienteilnehmer

Für die Teilnahme an der Studie erhalten Sie eine pauschale Entschädigung von CHF 400.- nach Abschluss der Experimente an vier Tagen im Labor des Swiss TPH.

Damit Ihnen der Betrag ausbezahlt werden kann, muss einerseits eine Arbeitsbewilligung in der Schweiz vorliegen und andererseits das Stammdatenblatt, welches Ihnen mit dieser Information für die Studienteilnehmer abgegeben wurde, zusammen mit der Einverständniserklärung vor Versuchsbeginn ausgefüllt und unterschrieben der Prüferin abgegeben werden.

13 Unfreiwilliger Studienabbruch

Ihre Teilnahme kann durch den Studienleiter oder die Prüferin abgebrochen werden, insbesondere bei allergischen Reaktionen auf Mückenstiche und Fieber oder bei Missachtung der Vorgaben des Studienleiters oder der Prüferin.

Bei allergischen Reaktionen ist zu Ihrer Sicherheit eine medizinische Abschlussuntersuchung notwendig. Diese Untersuchungen sind für Sie kostenlos.

14 Deckung von Schäden

Swiss TPH ersetzt Ihnen Schäden, die Sie gegebenenfalls im Rahmen der Studie erleiden.

Zu diesem Zweck hat Swiss TPH zu Ihren Gunsten eine Haftpflichtversicherung bei AXA Versicherungen AG (Police-Nr. 4.746.321) abgeschlossen.

Stellen Sie während oder nach dem Versuch gesundheitliche Probleme oder andere Schäden fest, so wenden Sie sich bitte entweder an die Prüferin (Frau Barbara Colucci) oder an den Versuchsleiter (Dr. Pie Müller). Sie werden für Sie die notwendigen Schritte einleiten.

15 Kontaktperson(en)

Bei Unklarheiten, Notfällen, unerwarteten oder unerwünschten Ereignissen, die während der Studie oder nach deren Abschluss auftreten, können Sie sich jederzeit an die nachfolgend aufgelistete Kontaktperson(en) wenden.

Prüferin: Frau Barbara Colucci
Tel. 061 284 86 12 (intern 8612)
barbara.colucci@unibas.ch

Studienleiter: Dr. Pie Müller
Tel. 061 284 82 41 (intern 8241)
pie.mueller@unibas.ch

24h Notfallnummer: 144 (intern)
061 284 81 44 (extern)

Summary of the report for the Federal Office of Public Health (FOPH): *“Evaluation von Repellentien gegen Stechmücken und deren Interpretation unter der Europäischen Biozidprodukteverordnung”*

Evaluation of mosquito repellents in view of the European Product Regulation

Biting mosquitoes (Diptera, Culicidae) are important vectors for several diseases such as malaria, filariasis and viral diseases (e.g. dengue, West-Nile fever or Zika virus infections). Topical mosquito repellents provide good personal protection against mosquito bites for several hours. However, there exist huge differences between protection times depending on the active ingredient and formulation of a product. The European Product Regulation (EPR) classifies repellents as biocides (product group PT 19) and as such they are subject to rigorous efficacy studies. To simplify the registration process for repellent products the European Union published guidelines with the requirements for efficacy studies. The guidelines leave, however, uncertainties as to how efficacy should be examined and how data from such studies may be evaluated in terms of label claim. An important question is whether data from laboratory studies may predict the formulation's efficacy in the field?

We analysed 4,008 publications systematically to identify how well field and laboratory data correlated with each other. The approach was to extract from the literature the complete protection times for four active ingredients; DEET, Icaridin, EBAAP and PMD and to compare the results between field and laboratory experiments. Additionally to the systematic literature study we carried out our own comparative study in both the laboratory and the field with the two active ingredients, DEET 15% and PMD 15%, and analysed the protection times.

In the published literature results from the field and the laboratory are not comparable. The methods and conditions under which the studies were carried out differed widely. The only general observation was that the higher the concentrations of the active ingredient the longer were the measured protection times. Our own study suggests that even under fairly standardised conditions, laboratory studies may not give very accurate predictions of how they would perform under field conditions. In our study the protection times were much higher in the field trial than measured in the laboratory experiments; we conclude that a formulation that shows good protection under laboratory conditions will also provide good protection under field conditions.

Im Auftrag des Bundesamtes für Gesundheit (BAG)

Evaluation von Repellentien gegen Stechmücken und deren Interpretation unter der Europäischen Biozidprodukteverordnung

Schlussbericht

Auftraggeber

Bundesamt für Gesundheit (BAG), Direktionsbereich Verbraucherschutz, Abteilung Chemikalien, CH-3003 Bern

Das Bundesamt für Gesundheit (BAG) ist Teil des Eidgenössischen Departements des Innern (EDI).

Auftragnehmer

Schweizerisches Tropen- und Public Health-Institut (Swiss TPH), Socinstrasse 57, Postfach, CH-4002 Basel

Autoren

Barbara Colucci

Dr. Pie Müller

Abkürzungen

BG	Firma Biogents (Deutschland)
CDC	Centers for Disease Control
CPT	Absolute Schutzdauer (Englisch: „Complete Protection Time“)
EPA	US Environmental Protection Agency
MALDI-TOF MS	Matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry
OT	Ovitrap; Eiablagefalle
%R	Relative Schutzwirkung (Englisch: „Relative Protection“)
Swiss TPH	Swiss Tropical and Public Health Institute (Deutsch: Schweizerisches Tropen- und Public Health-Institut)
WHO	World Health Organization (Deutsch: Weltgesundheitsorganisation)

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	4
1 Einleitung	5
2 Material und Methoden	6
2.1 Literaturanalyse	6
2.1.1 Literaturrecherche	6
2.1.2 Auswertung der vorhandenen Fachliteratur	7
2.2 Vergleichende Studie von Labor- und Feldmethoden zur Messung der Wirkungsdauer von Mückenschutzmitteln	8
2.2.1 Testsubstanzen	8
2.2.2 Studienteilnehmer	8
2.2.3 Studienorte	8
2.2.4 Experimenteller Ablauf im Feld	9
2.2.5 Artenzusammensetzung der Stechmücken im Feld	12
2.2.6 Experimenteller Ablauf im Labor	13
2.2.7 Statistische Auswertung	15
3 Resultate und Diskussion	17
3.1 Literaturanalyse	17
3.1.1 Literaturrecherche	17
3.1.2 Allgemeine Beobachtungen	17
3.1.3 Quantitative Auswertung	20
3.2 Vergleichende Studie von Labor- und Feldmethoden zur Messung der Wirkungsdauer von Mückenschutzmitteln	29
3.2.1 Absolute Schutzdauer (CPT)	29
3.2.2 Relative Schutzwirkung (%R)	31
3.2.3 Artenzusammensetzung der Stechmücken im Feld	36
4 Schlussfolgerungen und Empfehlungen	38
5 Dank	39
6 Literaturverzeichnis	40

Zusammenfassung

Stechmücken (Diptera, Culicidae) sind wichtige Krankheitsüberträger von Infektionskrankheiten wie Malaria, Filariosen, viralen Infektionen (z.B. Denguefieber, West-Nil-Fieber oder Zika Viruserkrankungen) oder sie sind ganz einfach Lästlinge. Einen guten, persönlichen Schutz gegen Mückenstiche bieten dabei Repellentien (Vergrämungsmittel), welche direkt auf die exponierte Haut aufgetragen werden. Der Schutz kann bis zu mehreren Stunden anhalten. Allerdings bestehen grosse Unterschiede in Bezug auf die Schutzdauer, abhängig von den aktiven Wirkstoffen und den Formulierungen. In der Europäischen Biozidprodukteverordnung werden Repellentien als Biozide deklariert (Produktgruppe PT 19) und unterstehen als solche rigorosen Wirksamkeitsstudien. Um die Registrierung solcher Produkte europaweit zu vereinfachen, hat die Europäische Union einen provisorischen, technischen Leitfaden für die Repellentientests herausgegeben. Dieser Leitfaden lässt jedoch viele für die Praxis wichtige Fragen offen. Unklar ist, wie die Wirksamkeitsstudien durchgeführt und die daraus gewonnenen Daten interpretiert werden sollen. Eine zentrale Frage dabei ist, wie vergleichbar sind gewonnene Daten aus Laborversuchen mit Resultaten aus Feldstudien? Wir haben 4'008 Publikationen systematisch gesichtet, um diesem Zusammenhang nachzugehen. Ziel der Analyse war es, die Schutzdauer für Formulierungen mit den Wirkstoffen DEET, Icaridin, EBAAP und PMD zu finden und die Resultate aus Feld- und Laborversuchen miteinander zu vergleichen. Zusätzlich zur Literaturrecherche haben wir ein Experiment durchgeführt mit dem Ziel, Daten über die Schutzdauer von zwei bekannten Wirkstoffen, DEET 15% und PMD 15%, sowohl im Labor wie auch im Feld zu generieren und diese anschliessend miteinander zu vergleichen. Die Daten aus der Literaturanalyse zeigen keinen klaren Zusammenhang zwischen Labor- und Feldversuchen. Ein Hindernis für die Analyse war die enorme Variabilität der Methoden und der Rahmenbedingungen, unter welchen die Studien durchgeführt wurden. Eine Ausnahme ist die allgemeine Beobachtung, dass ein höherer Wirkstoffanteil generell zu einer längeren Schutzzeit führt. Selbst unter den standardisierten Bedingungen wie in unserem Experiment, ist es schwierig aus den Labordaten genaue Vorhersagen für die Anwendung im Feld zu machen. Allerdings war die Schutzdauer im Feld um einiges länger als im Labor und es kann davon ausgegangen werden, dass ein Wirkstoff bzw. eine Formulierung, der bzw. die unter Laborbedingungen gute Resultate zeigt, auch im Feldversuch einen guten Schutz bietet.

1 Einleitung

Stechmücken (Ordnung Diptera, Familie Culicidae) spielen vor allem in tropischen und subtropischen Regionen eine wichtige Rolle als Krankheitsüberträger von Malaria, verschiedenen Formen der Filariose sowie zahlreichen Viren wie z.B. Zika, Dengue, Gelbfieber, West Nile oder Chikungunya. Obwohl Stechmücken in den meisten Ländern der gemässigten Klimazonen eine weniger wichtige Rolle als Überträger (Vektoren) von Krankheiten auf den Menschen spielen, können sie wegen ihrem aggressiven Stechverhalten auch hier als sehr lästig empfunden werden.

Mückenschutzmittel, sogenannte Repellentien bieten einen guten Schutz vor Mückenstichen. Repellentien sind Biozide und enthalten aktive Wirkstoffe, welche Schadorganismen fernhalten sollen. Repellentien gegen Mücken werden typischerweise auf die Haut aufgetragen. Danach verdampfen diese langsam und bilden eine Duftwolke, welche die Mücken vertreibt oder die anlockenden Komponenten des Körpergeruchs neutralisieren. Sobald die Substanzen verdampft sind, lässt der Schutz nach und die Mücken stechen wieder zu. Dabei hängt die Schutzdauer der Repellentien von vielen Faktoren ab, wie z.B. der aufgetragenen Menge, der lokalen Mückenpopulation, Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Wind oder der individuellen Attraktivität der einzelnen Person [1].

In der Schweiz, wie auch in der EU, sind Repellentien als Biozide (Produkteart 19: Repellentien und Lockmittel) klassifiziert und unterstehen der europäischen Biozidprodukteverordnung (BPR, Verordnung (EU) Nr. 528/2012). Die Biozidprodukteverordnung reguliert europaweit das Inverkehrbringen und die Verwendung von Biozidprodukten. Die Verordnung hat zum Ziel, einen hohen Schutz für Mensch und Umwelt zu garantieren, indem die Bedingungen für die Registrierung von Bioziden in allen EU-Mitgliedstaaten, mit Einbezug der Schweiz, gleich sind. Die Biozidprodukteverordnung schreibt ein zweistufiges Verfahren vor: Während die aktiven Substanzen auf EU-Ebene zugelassen werden, müssen die einzelnen Produkte mit diesen Substanzen von den Mitgliedstaaten bzw. der Schweiz einzeln begutachtet und zugelassen werden. Ein wichtiger Bestandteil der Regulierung ist, dass die Produkte in ihrer Anwendung wirksam sein müssen, d.h. im Falle der Repellentien, den Konsumenten vor Mückenstichen schützen.

Zurzeit werden Repellentien vorwiegend im sogenannten Käfigtests unter Laborbedingungen getestet [2, 3]. Im Käfigtest halten Testpersonen in regelmässigen Zeitabständen den mit Mückenschutzmittel behandelten Unterarm in einen Käfig mit hungrigen Stechmücken, die aus einer Laborzucht stammen. Dabei wird gemessen, über wie viele Stunden ein Produkt nach dessen Anwendung noch eine schützende Wirkung vor Stichen aufweist. Während die Laborversuche den Vorteil haben, dass die Experimente unter standardisierten Bedingungen durchgeführt werden können, ist unklar, wie die Ergebnisse auf die Anwendung im Feld umzusetzen sind. Diesem Umstand begegnet das vorliegende Projekt, in welchem einerseits die Daten aus publizierten Studien ausgewertet wurden und andererseits die gleichen Mückenschutzmittel sowohl im Labor wie auch im Feld mit denselben Studienteilnehmern getestet wurden.

2 Material und Methoden

In der ersten Phase des Projekts haben wir die zugängliche Literatur systematisch nach Publikationen durchsucht, in denen die vier gängigen Repellentien DEET, PMD, Icaridin und EBAAP (Tabelle 1) entweder in einem Labor- oder in einem Feldversuch evaluiert wurden.

In der zweiten Phase des Projekts testeten dieselben Studienteilnehmerinnen und Studienteilnehmer 15%-ige ethanolische Lösungen mit DEET oder PMD sowohl unter Laborbedingungen als auch im Feld. Damit wurde evaluiert, wie weit der Käfigtest unter standardisierten Laborbedingungen die Wirkungsdauer von Repellentien in der eigentlichen Anwendung voraussagen kann. Es wurden identische Konzentrationen der Mückenschutzmittel für die Versuche im Labor und im Feld gewählt, so dass vergleichbare Resultate aus den Experimenten gewonnen werden konnten.

Tabelle 1: Klassische Wirkstoffe mit repellierender Wirkung gegen Stechmücken

Wirkstoff	Andere Namen	Formel
Diethyltoluamid (DEET)	<ul style="list-style-type: none"> <i>N,N</i>-Diethyl-<i>m</i>-toluamid <i>N,N</i>-Diethyl-3-methylbenzamid 	$C_{12}H_{17}NO$
<i>p</i> -Menthan (PMD) ¹	<ul style="list-style-type: none"> 1-Methyl-4-isopropylcyclohexan 4-Isopropyl-1-methyl-cyclohexan 	$C_{10}H_{20}$
Icaridin	<ul style="list-style-type: none"> 1-(1-Methylpropoxycarbonyl)-2-(2-hydroxyethyl)piperidin Bayrepel Picaridin KBR3023 	$C_{12}H_{23}NO_3$
Ethylbutylacetylaminopropionat (EBAAP)	<ul style="list-style-type: none"> IR3535 3-(<i>N</i>-<i>n</i>-Butyl-<i>N</i>-acetyl-amino)propionsäureethylester Ethyl-<i>N</i>-acetyl-<i>N</i>-butyl-β-alaninat 	$C_{11}H_{21}NO_3$

¹ Hier wurden auch Studien mitberücksichtigt, welche die Wirksamkeit von Zitroneneukalyptusöl oder von dem daraus hergestellten Citriodiol untersuchten.

2.1 Literaturanalyse

Das Ziel der Literaturanalyse war es, einen Überblick über die bereits veröffentlichten Studien zur Evaluation von Repellentien gegen Mücken systematisch zu erfassen und die Ergebnisse zwischen Labor- und Feldstudien in einer Meta-Analyse miteinander zu vergleichen. Die Literaturanalyse wurde gemäss den PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) Vorgaben [4] durchgeführt.

2.1.1 Literaturrecherche

Fünf Online-Datenbanken (Tabelle 2) wurden mit den englischen Suchbegriffen „mosquito repellents“ und „mosquito repellent“ abgefragt, um sämtliche Labor- oder Feldstudien zur Wirkdauer von DEET, PMD, Icaridin oder EBAAP zwischen 1956, der Einführung von DEET,

bis Ende Dezember 2015 zu identifizieren. Zusätzlich zu den Datenbanken wurden auch die Literaturverzeichnisse in den einzelnen Publikationen nach weiteren Veröffentlichungen durchforstet.

Tabelle 2: Für die Literaturanalyse abgefragte Datenbanken.

Datenbank	URL
NCBI PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
ISI Web of Science	http://apps.webofknowledge.com
ScienceDirect	http://www.sciencedirect.com
Cochrane library	http://www.thecochranelibrary.com
LILACS	http://lilacs.bvsalud.org
Armed Forces Pest Management Board Literature Retrieval System	http://www.acq.osd.mil/eie/afpmb ¹

¹ Diese Datenbank ist in der Zwischenzeit nicht mehr zugänglich.

Die identifizierten Publikationen wurden systematisch in einer EndNote Datenbank (Version X7.1, Thomson Reuters) erfasst und Duplikate, welche in mehreren Online-Datenbanken vorhanden waren, wurden auf einen einzigen Eintrag reduziert. Zudem wurden Studien von der Analyse ausgeschlossen, wenn eine der folgenden Bedingungen nicht erfüllt war:

- Mindestens einer der vier aktiven Wirkstoffe DEET, Icaridin, PMD oder EBAAP (Tabelle 1) wurde getestet
- Die Formulierungen wurden auf der Haut aufgetragen
- Die aufgetragene Menge ist in der Publikation erwähnt
- Die Konzentration des Wirkstoffes ist angegeben
- Die Wirkstoffe waren nicht miteinander gemischt
- Die Versuche wurden am Menschen durchgeführt
- Als Endpunkt wurde die Dauer der Schutzwirkung gemessen

2.1.2 Auswertung der vorhandenen Fachliteratur

Für die Analyse wurden Erstautor, Erscheinungsjahr, Quellenangabe, Methoden und Studiendesign, aktiver Wirkstoff, Dosis und Applikationsmenge, Mückenart, Mückenkolonie, Alter der Mücken im Laborversuch, Stichprobengrösse, Anzahl Probanden (Anteil Frauen/Männer), exponierte Körperstelle (Arm, Bein), Testkondition (Labor oder Feld, Labor und Feld) sowie die Schutzdauer inkl. Angaben zur Statistik in einer MS Excel Tabelle aufgezeichnet und die Ergebnisse innerhalb und zwischen den Studien miteinander verglichen.

2.2 Vergleichende Studie von Labor- und Feldmethoden zur Messung der Wirkungsdauer von Mückenschutzmitteln

Zusätzlich zur Literaturrecherche wurde eine Studie durchgeführt mit dem Ziel, Daten über die Schutzdauer von zwei bekannten Wirkstoffen sowohl im Labor wie auch im Feld zu generieren und diese anschliessend miteinander zu vergleichen.

2.2.1 Testsubstanzen

In der vergleichenden Studie von Labor- und Feldmethoden wurden die Wirkstoffe DEET und PMD als 15%-ige (m/m) ethanolische Lösungen getestet. Die Formulierungen wurden freundlicherweise von der Firma Vifor Consumer Health AG eigens für diese Studie hergestellt.

DEET wurde 1946 von der US Armee entwickelt 1956 kommerziell vermarktet und gilt allgemein als „Goldstandard“ für Mückenschutzmittel [5]. DEET ist Bestandteil von vielen, kommerziell erhältlichen Produkten. Diverse Produkte mit DEET sind auch in der Schweiz zugelassen (<https://www.rpc.admin.ch>).

PMD ist ein alternativer Wirkstoff zu DEET, der ursprünglich aus Extrakten des Zitroneneukalyptus Baumes (*Eucalyptus citriodora*) gewonnen wurde [6]. Wie DEET ist auch PMD in zahlreichen, kommerziell erhältlichen Mückenschutzmitteln enthalten.

2.2.2 Studienteilnehmer

Die Testsubstanzen wurden am Menschen getestet, um Daten zu generieren, die möglichst die Realität abbilden. Insgesamt nahmen 8 Frauen und 10 Männer an der Studie teil, wobei eine Frau während der Studie ausfiel. Die Probanden wurden an der Universität Basel rekrutiert, mit der Bedingung, dass diese keine oder nur milde Reaktionen auf Mückenstiche zeigen durften. Mehr als 540 Bewerberinnen und Bewerber haben die Informationen zur Studie erhalten. Nach einem kurzen Gespräch mit allen interessierten Kandidaten wurden schliesslich 18 Personen per Los ausgewählt. Die Studienteilnehmerinnen und Studienteilnehmer wurden detailliert über die Studie informiert und gaben ihr schriftliches Einverständnis. Diese Studie wurde gemäss den schweizerischen medizinisch-ethischen Richtlinien durchgeführt und von der Ethikkommission Nordwest- und Zentralschweiz bewilligt (Referenznummer: EKNZ 2015-235).

Da verschiedene Faktoren einen Einfluss auf die Attraktivität einer Person für Stechmücken haben können, wurden die Teilnehmerinnen und Teilnehmer angewiesen, Alkohol, Koffein und duftende Kosmetikprodukte (wie z.B. Parfüm, Rasierwasser, Haarspray, Lotionen usw.) 12 Stunden vor und während eines Versuchs zu vermeiden. Das Rauchen war vor und während der Studie untersagt.

2.2.3 Studienorte

Die Feldexperimente wurden an zwei geografisch und ökologisch unterschiedlichen Studienorten durchgeführt (Abbildung 1). Der erste Studienort befand sich im Wiedervernässungsgebiet Langholz in der Gemeinde Rothrist im Kanton Aargau (E 7.87170, N 47.28607) und der zweite Durchführungsort lag im Naturschutzgebiet der Thurauen in der Gemeinde Ellikon am Rhein im Kanton Zürich (E 8.59496, N 47.59600).

Das Naturwaldreservat Langholz weist eine sehr hohe Artenvielfalt an Stechmücken auf [7].

Die Thuraunen sind bekannt für das grosse Vorkommen an Überschwemmungsmücken, *Aedes vexans*, in den Sommermonaten und so bot sich dieser Teil des Naturschutzgebietes in Flaach/Ellikon am Rhein für die Durchführung der Feldversuche an.

Die Feldversuche im Langholz wurden vom 20. Juli bis 12. August 2015 und die Feldversuche in den Thuraunen vom 17. bis 30. August 2015 durchgeführt. Die Laborversuche mit denselben 17 Probanden fanden vom 5. August bis 21. November 2015 am Swiss TPH in Basel statt.

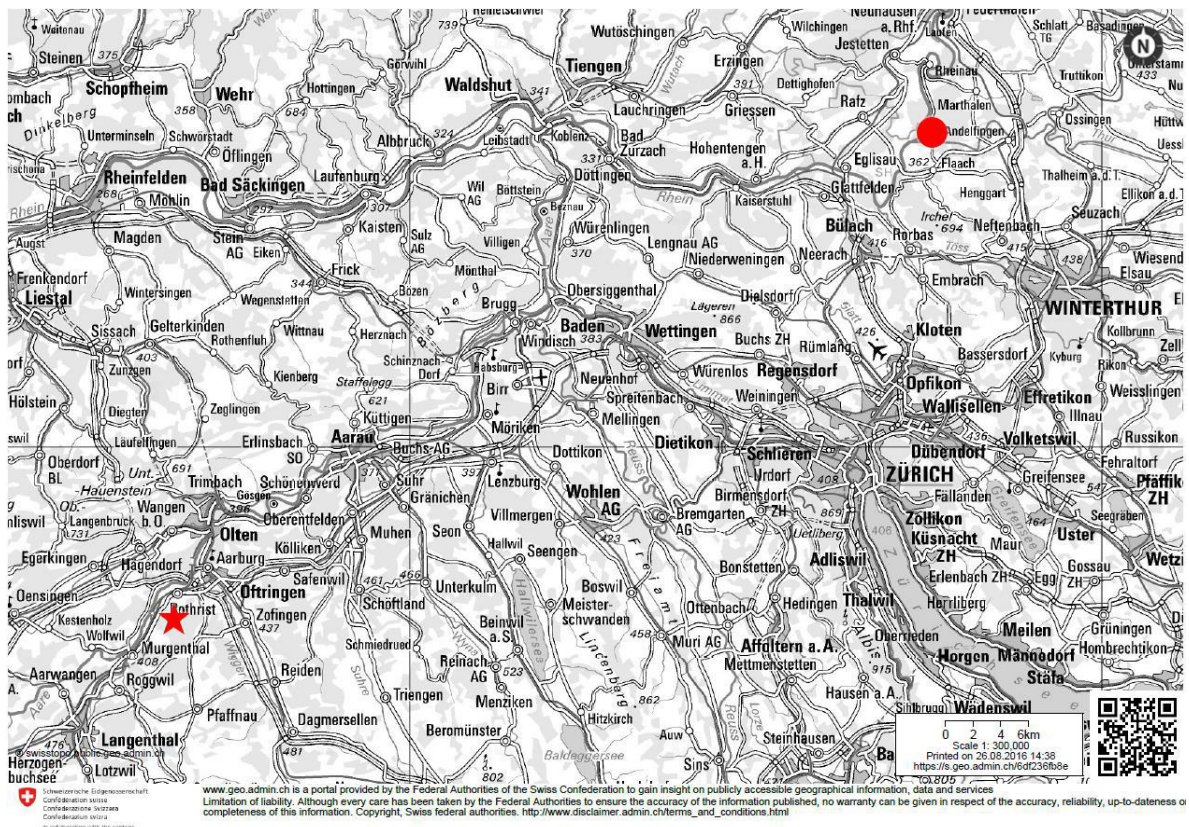


Abbildung 1: Studienorte, wo die Feldexperimente durchgeführt wurden. Roter Stern: Naturwaldreservat Langholz, Gemeinde Rothrist, Kanton Aargau (E 7.87170, N 47.28607). Roter Punkt: Naturschutzgebiet Thuraunen, Gemeinde Ellikon am Rhein, Kanton Zürich (E 8.59496, N 47.59600).

2.2.4 Experimenteller Ablauf im Feld

Im Feldversuch testete jede Teilnehmerin und jeder Teilnehmer jede Formulierung einmal an beiden Studienorten. Neben den beiden aktiven Wirkstoffen, DEET 15% und PMD 15%,

wurde im Feld auch eine Negativkontrolle mit 70% Ethanol getestet. Die Studie wurde „verblindet“ durchgeführt, so dass die Studienteilnehmerinnen und Studienteilnehmer nicht wussten, welche Formulierung sie an einem bestimmten Tag testeten. Die 18 Studienteilnehmerinnen und Studienteilnehmer wurden in drei Blöcken zu je 6 Personen eingeteilt, in denen die Behandlungen an 3 aufeinanderfolgenden Tagen getestet wurden (Abbildung 2). Am ersten Tag wurde durch Ziehung eines Loses festgelegt, welche Behandlungen die Studienteilnehmerinnen und Studienteilnehmer an den jeweils drei Tagen erhalten. Dabei wurden die Behandlungen innerhalb eines experimentellen Blockes so rotiert, dass einerseits an einem Tag jede Behandlung bei zwei Personen getestet wurde und andererseits die Abfolge in den Behandlungen von einem auf den anderen Tag bei niemandem gleich war (Z.B. Person 1: DEET – PMD – Kontrolle, Person 2: PMD – Kontrolle – DEET, etc.; Abbildung 2). Dieses Design diente dazu, negative Einflüsse auszugleichen, die einerseits durch mögliche Tageseinflüsse (z.B. durch Wetterbedingungen, Mückenvorkommen) und andererseits durch den Wechsel von einer auf die andere Behandlung entstehen könnten.

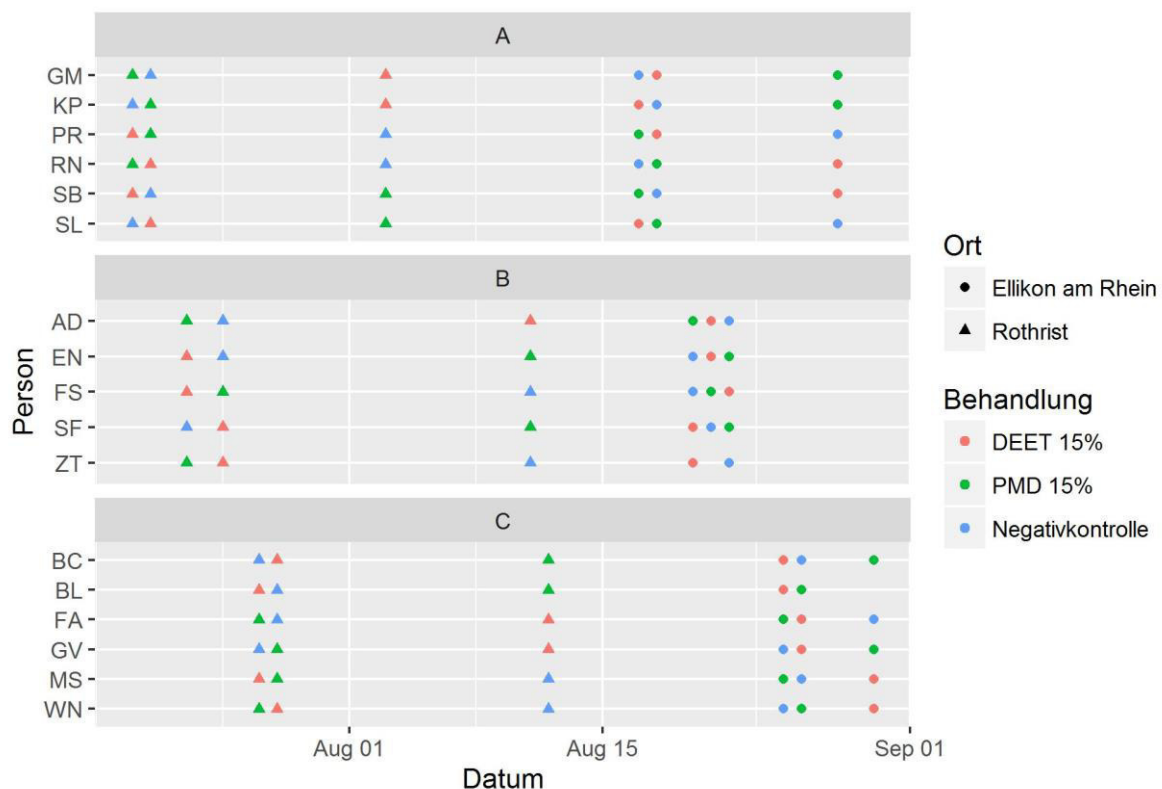


Abbildung 2: Rotationsschema der Behandlungen im Feldversuch. Die drei Formulierungen, DEET 15%, PMD 15% und die Negativkontrolle wurden bei jeder Studienteilnehmerin und jedem Studienteilnehmer einmal an jedem Standort aufgetragen. Die 18 Studienteilnehmerinnen und Studienteilnehmer waren in 3 Blöcke, A, B und C, eingeteilt. Ursprünglich waren in jedem Block 6 Personen, jedoch verliess eine dem Block B zugeteilte Person vorzeitig die Studie, so dass in diesem Block nur Daten von 5 Personen für die Auswertung blieben.

Um die passende Menge an Mückenschutzmittel für jede einzelne Person zu eruieren, wurde die Unterschenkelfläche der Studienteilnehmerinnen und Studienteilnehmer berechnet. Dazu wurde die Länge des Unterschenkels multipliziert mit dem Mittelwert aus drei Messungen: Umfang unterhalb des Knies, Mitte des Unterschenkels und über dem Fussknöchel. Die

Standardddosis betrug 1 ml Mückenschutzmittel pro 600 cm² Hautfläche gemäss Vorgaben der WHO [3].

Vor dem Experiment wurde der Unterschenkel zuerst mit geruchsneutraler Seife gewaschen, dann mit Wasser abgespült und am Ende mit einem Alkohol getränkten Tüchlein abgewischt. Danach wurde der Unterschenkel mit einer der drei Formulierungen (DEET 15%, PMD 15% oder Negativkontrolle) behandelt und der Rest des Körpers wurde durch einen Ganzkörperschutzanzug, einen Imkerhelm und Latexhandschuhen vor Mückenstichen geschützt (Abbildung 3).



Abbildung 3: Exposition im Feld.

Für das Experiment im Feld wurde einer der beiden Unterschenkel mit dem Repellent behandelt und der Rest des Körpers wurde durch einen Ganzkörperschutzanzug, einen Imkerhelm und Latexhandschuhen vor Mückenstichen geschützt. Landende Stechmücken wurden mit einem Saugrohr eingefangen und für die Bestimmung der Mückenart im Labor aufbewahrt.

Eine Stunde nach Auftragen der Testformulierung (Einwirkzeit), nahmen die Studienteilnehmerinnen und Studienteilnehmer eine von 6 Sitzpositionen im Feld ein. Diese Positionen wurden bereits im Vorfeld zufällig zugeteilt und auf dem Protokollblatt notiert, so dass der Ablauf für die gesamten 6 Stunden für alle 6 Probanden festgelegt war. Die Positionen waren mindestens 20 Meter voneinander entfernt, um den Einfluss auf das Stechverhalten der Mücken durch den Nachbarn möglichst gering zu halten (Tabelle 3).

Tabelle 3: Rotationsschema für die Positionierung der Studienteilnehmer im Feld.

Position	1. Stunde	2. Stunde	3. Stunde	4. Stunde	5. Stunde	6. Stunde
1	S.1	S.2	S.6	S.3	S.5	S.4
2	S.2	S.3	S.1	S.4	S.6	S.5
3	S.3	S.4	S.2	S.5	S.1	S.6
4	S.4	S.5	S.3	S.6	S.2	S.1
5	S.5	S.6	S.4	S.1	S.3	S.2
6	S.6	S.1	S.5	S.2	S.4	S.3

S.1, S.2, ..., S.6 repräsentieren die 6 Studienteilnehmer an einem Tag.

Nachdem die Positionen eingenommen wurden, sammelten die Studienteilnehmerinnen und Studienteilnehmer während 30 Minuten alle auf dem Unterschenkel landenden Stechmücken mit Hilfe eines speziellen Saugrohres und überführten diese in dafür vorbereitete Behälter. Das Einfangen von Stechmücken ist nicht einfach und wurde deshalb von allen Probanden vor dem Feldversuch in einem Probelauf mit frei fliegenden Stechmücken aus der Laborzucht geübt, genauso, wie der Umgang mit der Schutzkleidung. Mücken, die nicht eingefangen werden konnten, wurden ebenfalls als Landung gezählt und im Protokoll als solche vermerkt. Nachdem die 30 Minuten abgelaufen waren, folgten 30 Minuten Pause, in welcher alle Probanden die Versuchszone verliessen. Dieser Vorgang wurde stündlich wiederholt bis zur sechsten Stunde nach Applikation der Formulierung, wobei die Studienteilnehmerinnen und Studienteilnehmer jeweils zu einer neuen Position wechselten. Somit waren am Ende der 6 Stunden alle einmal an jeder Position (Tabelle 3).

Die Feldexperimente starteten in der Regel zwischen 15:30 und 16:00 Uhr, so dass die gesamte Dämmerungszeit abgedeckt war. Damit auch nach der Dämmerung noch Mücken eingefangen werden konnten, wurden die Studienteilnehmerinnen und Studienteilnehmer mit Stirnlampen ausgerüstet.

2.2.5 Artenzusammensetzung der Stechmücken im Feld

Die von den Studienteilnehmerinnen und Studienteilnehmern eingefangenen Mücken wurden eingefroren und anschliessend, soweit möglich, morphologisch bis auf ihre Art identifiziert. Die morphologische Bestimmung erfolgte unter dem Binokular nach den Bestimmungsschlüsseln von Schaffner *et al.* [8] und Becker *et al.* [9]. Dort, wo eine morphologische Bestimmung nicht möglich war (z.B. bei Artenkomplexen, beschädigten Exemplaren) sowie als Qualitätskontrolle, wurden einzelne Exemplare auch mit Hilfe von Matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) eingemessen und gegen Spektren in einer validierten Datenbank verglichen.

MALDI-TOF MS ist ein Verfahren zur Ionisation von Molekülen. Dazu werden Laserimpulse auf das Probenmaterial und die Matrix geschossen und die davonfliegenden Moleküle werden aufgezeichnet. Für die Untersuchung mit MALDI-TOF MS wurde adulten Stechmücken das Abdomen abgetrennt und nur Thorax, Kopf und Beine verwendet. Im Abdomen würden die Proteine, welche von einer Blutmahlzeit stammen könnten, die Auswertung erschweren. Das zu untersuchende Material wurde in Ameisensäure aufgelöst, auf eine Stahlplatte aufgetragen und mit Sinapinsäure versehen. Die Mückenpräparationen und MALDI-TOF MS Messungen wurden bei der Firma Mabritec AG in Riehen, Basel-Stadt, durchgeführt.

Um zusätzlich zu den auf der Haut landenden Mücken eine allgemeine Charakterisierung der vorhandenen Mückenarten zu haben, wurden zusätzlich zwei Typen von Adultfallen aufgestellt (Abbildung 4), die BG Sentinel Falle (Biogents, Deutschland) und die CDC Miniatur-Lichtfalle (John W. Hock Company, USA). Während die BG Sentinel Falle mit einem synthetischen Lockstoff ausgerüstet war, hing über der CDC Lichtfalle ein Behälter mit Trockeneis, um mit dem Kohlenstoffdioxid (CO₂) herumfliegende, weibliche Stechmücken anzulocken. Die mit einem Akku betriebenen Fallen wurden jeweils am Versuchstag aufgestellt und dann am Folgetag wieder abgebaut. Die gesammelten Mücken wurden zur Bestimmung ins Mückenlabor am Swiss TPH gebracht, morphologisch untersucht und falls nötig weiter mittels MALDI-TOF MS identifiziert.

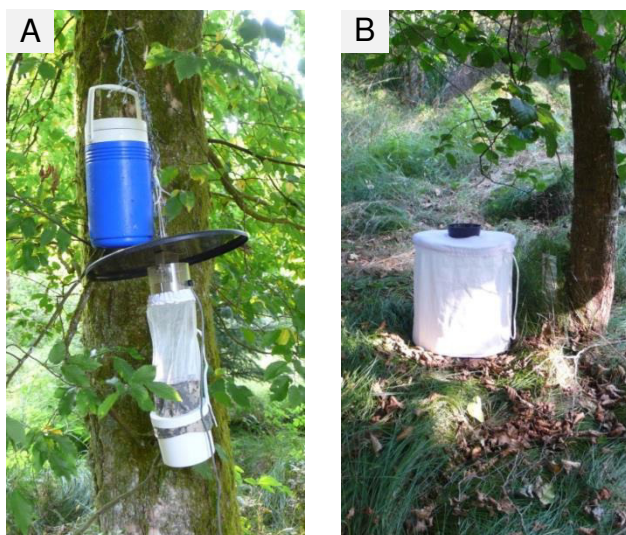


Abbildung 4: CDC Miniatur-Lichtfalle und BG Sentinel Falle. (A) CDC Lichtfalle mit Trockeneisbehälter (blau), um frei herumfliegende Weibchen einzufangen. (B) BG Sentinel Falle für das Fangen von ausgewachsenen Stechmücken verschiedener Arten.

2.2.6 Experimenteller Ablauf im Labor

Im Anschluss an die Feldversuche wurden die Formulierungen DEET 15% und PMD 15% mit denselben Studienteilnehmerinnen und Studienteilnehmern unter Laborbedingungen im WHO Käfigtest evaluiert [3]. Die Laborversuche fanden zwischen dem 5. August und 21. November 2015 statt.

Als Versuchstiere dienten jeweils 200, 5 bis 10 Tage alte, weibliche Stechmücken in einem WHO Testkäfig (Abbildung 5). Die in den Versuchen eingesetzten Stechmücken erhielten vor dem Test kein Blut und jede Studienteilnehmerin und Studienteilnehmer hatte einen eigenen Testkäfig, um das Risiko von Infektionen auszuschliessen. Jede Person testete beide Formulierungen einmal mit den drei folgenden Mückenarten: die Gelbfiebermücke, *Aedes aegypti* (Linnaeus), die primäre Malariamücke in Asien *Anopheles stephensi* (Liston) sowie die Südlichen Hausmücke, *Culex quinquefasciatus* (Say) (Abbildung 6). Die eingesetzten Mückenarten werden von der WHO für Repellentienstudien empfohlen und am Swiss TPH gezüchtet.



Abbildung 5: WHO Testkäfig. Ein mit Mückenschutzmittel behandelter Unterarm einer Versuchsperson wird in den Testkäfig gehalten. Der Deckel und die beiden Seitenwände des 40 cm x 40 cm x 40 cm grossen Testkäfigs bestehen aus Plexiglas. Zusammen mit einem am Boden angebrachten Spiegel lässt sich das Verhalten der Stechmücken leicht beobachten.



Abbildung 6: Stechmückenarten im WHO Käfigtest. (A) Weibchen einer Gelbfiebermücke, *Aedes aegypti* (Foto: Joachim Pellikan, Swiss TPH). **(B)** Weibchen einer *Anopheles stephensi* (Foto: James Gathany, CDC, Public Health Image Library). **(C)** Weibchen einer Südlichen Hausmücke, *Culex quinquefasciatus* (Foto: James Gathany, CDC, Public Health Image Library).

Ae. aegypti, die Gelbfiebermücke, ist eine tagaktive, tropische Mückenart und ist dort der wichtigste Vektor von Gelbfieber-, Dengue-, Chikungunya- und Zika-Viren. Die Gelbfiebermücke zeigt ein äusserst aggressives Stechverhalten und bevorzugt den Menschen als Wirt für ihr Blutmahl.

An. stephensi ist ein wichtiger Vektor für die Übertragung von *Plasmodium falciparum* und *P. vivax* Malaria-Erregern und ist von Nahost über den indischen Subkontinent bis hin nach China verbreitet. Weibliche *An. stephensi* stechen bevorzugt Menschen und dringen dazu nachts in Häuser ein. Neben Menschen stechen sie aber auch Tiere um an ihre Blutmahlzeit zu gelangen.

Cx. quinquefasciatus, die Südliche Hausmücke, ist in den Tropen und Subtropen verbreitet und nahe verwandt mit der bei uns beheimateten nördlichen Hausmücke, *Cx. pipiens*. Diese Mückenart verbreitet das St. Louis Enzephalitis- und West-Nil-Virus sowie Filariosen. Die Weibchen kommen in der Dämmerung in die Häuser und zeigen die höchste Stechaktivität um Mitternacht. Diese Mückenart reagiert in der Regel viel empfindlicher auf Repellentien als die anderen beiden anthropophilen Stechmückenarten.

Für die Tests wurden die hungrigen, weiblichen Mücken von einem Käfig entnommen, in welchem sowohl Weibchen wie auch Männchen gehalten wurden, sodass die Mücken sich paaren konnten. Die ausgewachsenen Stechmücken hatten Zugang zu einer 10%-igen Zuckerlösung und Wasser, wurden jedoch nicht mit Blut gefüttert. Für die Entnahme der Stechmückenweibchen wurde eine Hand in die Nähe des Käfigs gehalten, um die hungrigen Mücken anzulocken. Diese wurden dann mit einem Saugrohr vom Stammkäfig in den Testkäfig überführt.

Die Käfigtests am Swiss TPH begannen je nach Aktivitätsperiode der eingesetzten Stechmückenart entweder um 9 Uhr morgens mit der tagaktiven *Ae. aegypti* oder um 14 Uhr nachmittags mit der nachtaktiven *An. stephensi* oder *Cx. quinquefasciatus* Mücken. In der Zucht werden die Stechmücken bei einem Hell-Dunkel-Zyklus von 12 Stunden gehalten, wobei um 14 Uhr jeweils das Licht im Zuchtraum ausgeht, um die Nacht zu simulieren. Die Versuche mit der Gelbfiebermücke wurden bei hellem, künstlichem Licht mit einer Stärke von

678 Lux durchgeführt und die Versuche mit *An. stephensi* und *Cx. quinquefasciatus* im Dunkeln, also für die Mücken nicht sichtbarem Rotlicht mit einer Stärke von 53 Lux. Um verlässliche und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurden sowohl die Mücken zucht wie auch die Verhaltensversuche unter standardisierten Bedingungen bei einer Temperatur

von 27 ± 2 °C, und einer relativen Luftfeuchtigkeit von $65 \pm 5\%$ durchgeführt.

Als Vorbereitung für die Versuche wurde als erstes die Unterarmflächen aller Studienteilnehmerinnen und Studienteilnehmer berechnet, um die passenden Mengen an Mückenschutzmittel für jeden einzeln zu eruiieren. Die Unterarmfläche ergab sich aus dem Mittelwert des Umfangs von Handgelenk, Ellbogen und Mitte des Unterarms, multipliziert mit der Länge zwischen Ellbogen- und Handgelenk. Aufgrund der berechneten Oberfläche wurde eine Standardddosis von 1 ml Mückenschutzmittel pro 600 cm² Hautfläche aufgetragen.

Vor jedem Käfigtest wurde den Studienteilnehmerinnen und Studienteilnehmern die Körpertemperatur mit einem Ohrthermometer gemessen, um potentiell infektiöse Teilnehmer vom Versuch auszuschliessen. Danach wurde die Testfläche (Unterarm) der Studienteilnehmer zuerst mit geruchsneutraler Seife gewaschen, mit Wasser gespült und mit einem Tuch getrocknet. Anschliessend wurde der Unterarm mit einem Alkohol getränkten Tüchlein abgerieben.

Nach der Reinigung des Unterarms, aber noch vor der Behandlung mit einem Mückenschutzmittel, wurde die Stechaktivität der Mücken im WHO Käfig kontrolliert, indem der noch unbehandelte Unterarm in den Käfig mit den 200 Mückenweibchen gehalten wurde (Abbildung 5). Es wurde entweder die Zeit bis zur zehnten Mückenlandung auf dem Unterarm gemessen oder die Anzahl Mücken gezählt, die innerhalb von 60 Sekunden auf dem Unterarm landeten. Danach wurde der Unterarm entweder mit DEET 15% oder PMD 15% mit der zuvor berechneten Menge durch Aufpipettieren und regelmässigem Verstreichen der Formulierung sorgfältig behandelt. Der Versuch war verblindet, so dass die Studienteilnehmerinnen und Studienteilnehmer nicht wussten, welche der beiden Formulierungen aufgetragen wurde. Damit wurde sichergestellt, dass die Resultate nicht unbewusst beeinflusst wurden.

Die unbehandelte Hand wurde mit einem Handschuh aus Latex geschützt, durch welchen die Mücken nicht durchstechen konnten. Die Probanden wurden angewiesen, die behandelten Flächen während der gesamten Versuchsdauer nicht mechanisch zu belasten, um ein Abreiben der Formulierung zu vermeiden.

Nach 30 Minuten Einwirkzeit hielten die Probanden ihren behandelten Unterarm erstmals für maximal 3 Minuten in den Käfig. Die Zeit der ersten und zweiten Landung wurde notiert. Nach der zehnten Landung durften die gelandeten Mücken abgeschüttelt und der Unterarm aus dem Käfig gezogen werden, wobei die Zeit bis zur zehnten Landung mit einer Stoppuhr aufgezeichnet wurde. Dieser Vorgang wurde anschliessend alle 30 Minuten wiederholt bis zur sechsten Stunde.

Am Ende des Versuches wurde die Stechaktivität der Mücken erneut kontrolliert. Dazu wurde der behandelte Unterarm genau wie vor Versuchsbeginn gereinigt und danach wiederum entweder für 60 Sekunden oder bis zur zehnten Landung in den Käfig gehalten.

2.2.7 Statistische Auswertung

Die auf den Protokollblättern aufgezeichneten Daten wurden in eine Microsoft Excel Tabelle eingegeben und dann Protokollblatt für Protokollblatt nachkontrolliert. Damit wurde sichergestellt, dass bei der elektronischen Erfassung keine Fehler entstanden. Anschliessend wurden die tabulierten Daten als Text exportiert und in der Open Source Statistiksoftware R, Version 3.3.0 (<http://www.R-project.org>), eingelesen und ausgewertet. Die Grafiken wurden mit dem

ggplot2 Paket erstellt [10].

Als Endpunkte für die Schutzwirkung wurde einerseits die absolute Schutzdauer (Engl. „complete protection time“. Abkürzung: „CPT“) sowie die Landerate in Abhängigkeit der Zeit nach der Applikation berechnet.

Die absolute Schutzdauer entspricht hier der Dauer von der Applikation der Formulierung bis zum Intervall, in welchem die erste Mückenlandung erfolgte. Die durchschnittliche absolute Schutzdauer (Median und 95% Konfidenzintervall) über alle 17 Studienteilnehmerinnen und Studienteilnehmer wurde mit Hilfe einer Kaplan-Meier Überlebenszeitanalyse im R Paket `survival` [11] bestimmt. Die absolute Schutzdauer zwischen den einzelnen Formulierungen wurde mit dem Mantel-Haenszel Test [12] verglichen und stratifiziert nach Studienteilnehmerinnen und Studienteilnehmer.

Neben der absoluten Schutzdauer wurde auch die Landerate, d.h. Anzahl Landungen pro Sekunde, für jede Exposition berechnet. Die Landerate entspricht der Anzahl Landungen geteilt durch die Expositionsdauer. Die durchschnittliche Landerate wurde mit einem Generalisierten Linearen Model (GLM; Engl. „Generalised Linear Model“) mit einer negativen Binomialverteilung sowie einer Log-Link-Funktion geschätzt. Unterschiede in der Expositions-
dauer wurde mit einem fixen Wert (Engl. „Offset“), dem Logarithmus der Expositions-
dauer, in den erklärenden Variablen Rechnung getragen. Für die Feld- und Laborversuche wurde je ein separates GLM erstellt.

Aufgrund der Landerate in der Negativkontrolle und des behandelten Arms bzw. Unterschenkels wurde zusätzlich auch die relative Schutzwirkung berechnet. Die relative bzw. prozentuale Schutzwirkung ($\%R$) entspricht dem prozentualen Verhältnis der Anzahl Mücken pro Sekunde, die auf dem behandelten Unterarm bzw. Unterschenkel landeten (T), im Verhältnis zur Anzahl Mücken pro Sekunde, die in der Kontrolle auf der unbehandelten bzw. nur mit Ethanol behandelte Fläche gelandet waren (K):

$$\%R = \frac{K-T}{K} \times 100 \quad (1)$$

Während sich im Feldversuch der Referenzwert (K) aus der durchschnittlichen Landerate in der Negativkontrolle ergab, wurde im Laborversuch für K der Mittelwert über alle Messungen genommen.

Für die statistischen Tests wurde das Signifikanzniveau bei $\alpha = 0.05$ festgelegt.

3 Resultate und Diskussion

3.1 Literaturanalyse

3.1.1 Literaturrecherche

Von den insgesamt 4'008 gesichteten Artikeln enthielten 29 Publikationen Informationen, die gemäss unseren Vorgaben in die Analyse aufgenommen werden konnten (Abbildung 7). Darunter befanden sich 8 Publikationen, bei welchen in derselben Studie Labor- und Felddaten Seite an Seite verglichen wurden (Tabelle 4). In den restlichen 21 Artikeln wurden 12 Feldstudien (Tabelle 5) und 9 Laborstudien (Tabelle 6 und [13, 14]) beschrieben. Unter den Laborstudien wurden die Arbeiten von Barnard *et al.* [13] und Khan *et al.* [14] für die statistische Auswertung ausgeschlossen, da diese Studien nicht in erster Linie die Wirkungsdauer einer bestimmten Formulierung, sondern das Verhalten der Stechmücken unter gewissen Bedingungen bei einer Versuchsperson untersuchten.

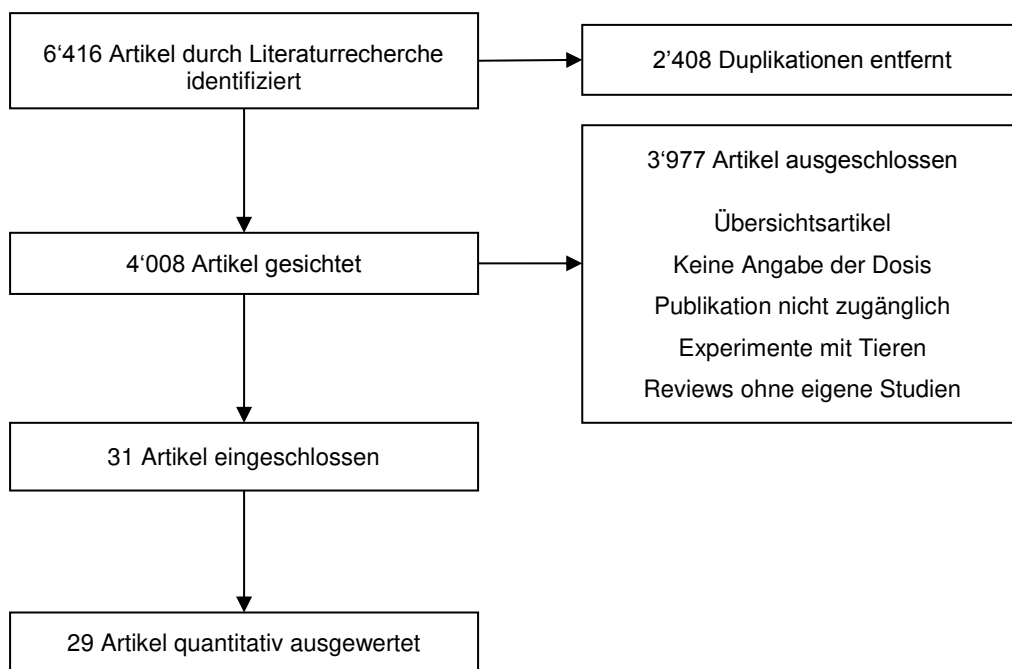


Abbildung 7: Selektion der identifizierten Publikationen für die systematische Literaturstudie.

3.1.2 Allgemeine Beobachtungen

Methoden

Acht Studien mit vergleichenden Labor- und Feldstudien wurden durchgeführt (Tabelle 4). In allen Studien war die Methode für den Feldversuch der Human Landing Catch (HLC), d.h. das Einfangen von landenden oder stechenden Mücken. Allerdings unterschieden sich die Studien stark im Versuchsaufbau, insbesondere in der Anzahl und Positionierung der Studienteilnehmer, der Einwirkzeit der Mückenschutzmittel, der Aufenthaltsdauer im Feld oder

die Rotation der Plätze. Deshalb ist ein objektiver Vergleich der Feldmethoden kaum möglich. Ähnlich sah es bei den Labormethoden aus, welche ebenfalls stark variierten, sei es die Grösse der Versuchskäfige, die Anzahl Stechmücken pro Käfig und deren Alter oder die Anzahl Studienteilnehmer. Obwohl die Studien beabsichtigten, die Wirkungen der gleichen Mückenschutzformulierungen im Labor- und Feldversuch gegeneinander zu vergleichen, waren die Methoden derart verschieden, dass ein solcher Vergleich kaum zulässig ist. Es kam sogar vor, dass im Feld und im Labor nicht die gleichen aktiven Wirkstoffe getestet wurden und die Studienteilnehmer in den beiden Experimenten nicht dieselben waren. Eine Hauptschwierigkeit lag auch darin, dass die Messung der Schutzdauer im Labor und im Feld nicht dieselbe war, sodass ein qualitativer Vergleich mit viel Vorbehalt vorgenommen werden muss.

Wie bei den kombinierten Feld-/Laborstudien wurde auch bei den reinen Feldversuchen die Human Landing Catch (HLC) Methode eingesetzt. Bei dieser Methode hat der Studienteilnehmer in der Regel den Unterschenkel mit dem zu testenden Mückenschutzmittel eingerieben und sammelt die darauf früher oder später landenden Stechmücken ein. Dabei ist wichtig, dass der Studienteilnehmer die Mücken einfängt, bevor diese zustechen, um die Übertragung von möglichen Krankheiten durch die Stechmücke zu verhindern. Allerdings gab es auch Studien, in denen die Studienteilnehmer explizit angewiesen wurden zuzuwarten, bis die Mücken zugestochen hatten (Siehe z.B. Uzzan *et al.* [15]). Eine weitere aber sehr wichtige Schwierigkeit beim Vergleich von Labor- und Feldstudien war der Umstand, dass sich in der Regel die Stechmückenarten im Feld und im Labor wie auch innerhalb der Labor- und Feldstudien unterschieden. Weitaus am häufigsten wurden die Versuche mit der Gelbfiebertmücke, *Ae. aegypti*, durchgeführt (**Error! Reference source not found.**). Neben *Ae. aegypti* war auch *Cx. quinquefasciatus* eine beliebte Mückenart im Labor sowie *Cx. annulirostris* im Feld.

Trotz Empfehlungen über die Auftragsmenge durch die EPA [2] und die WHO [3] variieren die Mengen an aufgetragenen Mückenschutzmittel pro Bein beträchtlich in den analysierten Publikationen. Dies erschwert den Vergleich zwischen den einzelnen Studien, auch wenn identische Wirkstoffe getestet wurden. In der statistischen Analyse wurde diesem Umstand Rechnung getragen, indem zusammen mit der Konzentration des Wirkstoffes die effektive Menge an aufgetragenem Wirkstoff berechnet wurde (siehe Kapitel 3.1.3).

In den Laborstudien war der Käfig Test (Engl. „Arm-in-cage test“) die Methode, mit welcher Mückenschutzmittel im Labor fast ausschliesslich geprüft wurden. Eine Ausnahme ist die Studie von Tawatsin *et al.* [16], in der auch mit freifliegenden Mücken in einem Raum getestet wurde. Die Grösse der Käfige, wie auch die Stechmückenarten, Anzahl Mücken pro Versuch, Alter der Stechmücken und Haltungsbedingungen werden von der EPA und der WHO in deren Guidelines angegeben [2, 3]. Allerdings handelt es sich auch hier nur um Empfehlungen und nicht um feste Regeln. Deshalb waren gerade in diesen Bereichen grosse Unterschiede zwischen den Studien zu finden. So variierte die Menge an Stechmücken pro Versuch von 10 bis 250 Tieren pro Testkäfig und die Käfiggrösse variierte zwischen 14'520 und 150'000 cm³. Dabei wurde in Experimenten gezeigt, dass die Grösse der Käfige und Anzahl der darin enthaltenen Mücken einen Einfluss auf die Ergebnisse hat [13]. Das Alter der Mücken entsprach nur selten der Empfehlung der WHO [3] von 5-7 Tagen oder laut EPA [2] 5-10 Tagen. All diese Faktoren beeinflussen die Ergebnisse und erschweren einen direkten Vergleich zwischen den unterschiedlichen Studien.

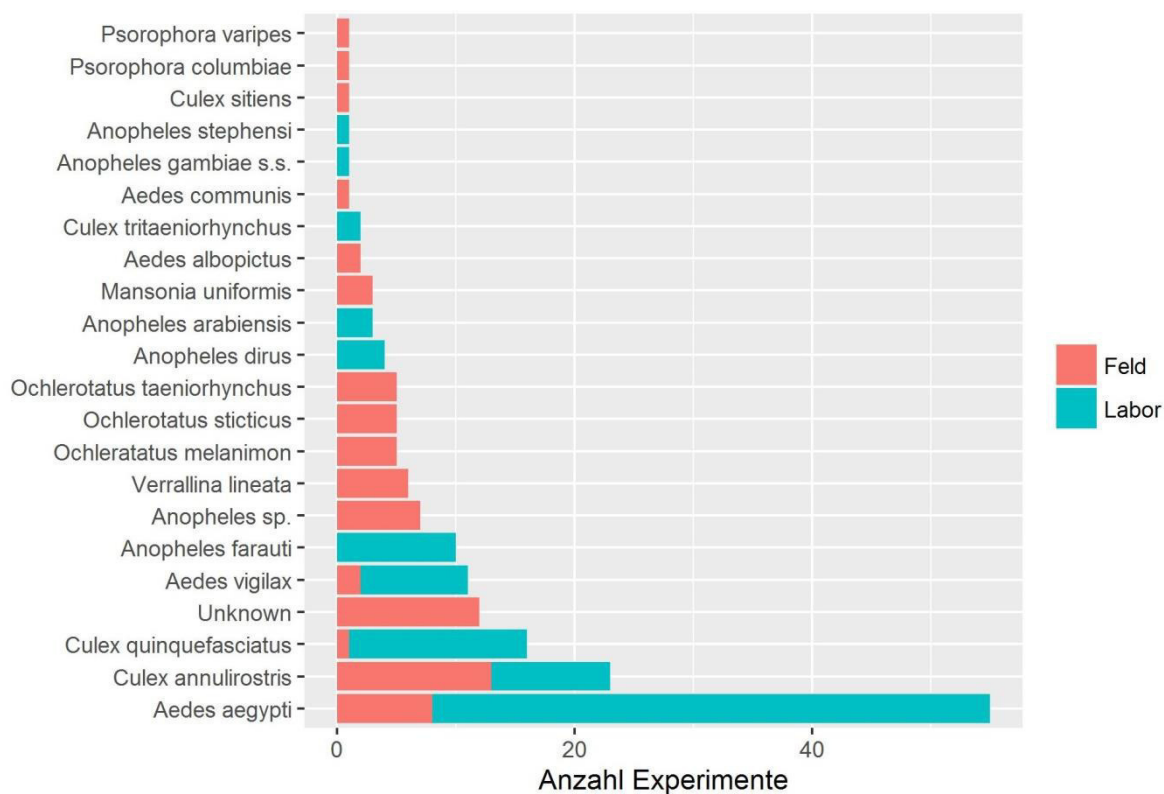


Abbildung 8: Häufigkeit der untersuchten Arten. Bei den Feldversuchen wurde entweder nur die häufigste Art aufgeführt oder diejenige, die in den Studien explizit ausgewertet wurde. „Unknown“ bedeutet, dass in der Studie keine Angaben zur Mückenart gemacht wurden.

Studienteilnehmerinnen und Studienteilnehmer

Die Anzahl der Probanden im Feld schwankt ebenfalls sehr stark zwischen 2 und 100 Probanden mit einem Median von gerade nur 5 Probanden pro Versuch. Nicht alle Stechmückenarten werden gleich stark von bestimmten aktiven Wirkstoffen abgeschreckt, nicht für alle Menschen ist ein Wirkstoff wirksam und die „Attraktivität“ eines Menschen für eine Mücke kann sehr stark variieren. Eine grössere Stichprobe als in den meisten Publikationen wäre also zwingend nötig, um eine aussagekräftigere Empfehlung über die allgemeine Schutzwirkung eines Wirkstoffs geben zu können.

Schutzzeiten

In der Regel wird die komplette Schutzzeit (Engl. „complete protection time“; CPT) angegeben. Diese wird berechnet vom Auftragen des Mückenschutzmittels bis zur ersten Landung oder dem ersten Stechversuch einer Stechmücke. Häufig wurde in den analysierten Publikationen jedoch nicht der erste Stich, sondern der erste, bestätigte Stich gezählt, also der zweite Stich innerhalb einer Exposition oder zwei direkt aufeinander folgenden Expositionen (häufig im Abstand von 30 Minuten). Als Alternative zur CPT wurde auch der prozentuale Schutz (%R) gemessen, bei welchem die Anzahl Stiche auf dem behandelten Bein mit der Negativkontrolle (ohne Mückenmittel) verglichen wurde. Da einerseits die CPT von einigen wenigen „extrem“ aggressiven Mücken beeinflusst werden kann und andererseits der relative Schutz von der „Attraktivität“ der Negativkontrolle abhängt, sind diese beiden Endpunkte nicht direkt miteinander vergleichbar. Während in den Feldversuchen häufig der relative Schutz über einen bestimmten Zeitraum berechnet wird, findet die CPT vor allem ihre Anwendung in den im Labor durchgeführten Käfigtests.

3.1.3 Quantitative Auswertung

Trotz den oben aufgeführten Schwierigkeiten haben wir einen Versuch unternommen, die Ergebnisse der gesichteten Arbeiten in einer statistischen Übersicht zu präsentieren. In der quantitativen Auswertung war das Ziel, die Schutzdauer in Abhängigkeit der effektiv aufgetragenen Wirkstoffmenge für Labor- und Feldversuche zu analysieren. Dazu wurden sämtliche Ergebnisse der 29 Studien (Tabellen 4-6) in einer Excel Tabelle erfasst und im Statistikpaket R grafisch ausgewertet (Abbildung 9).

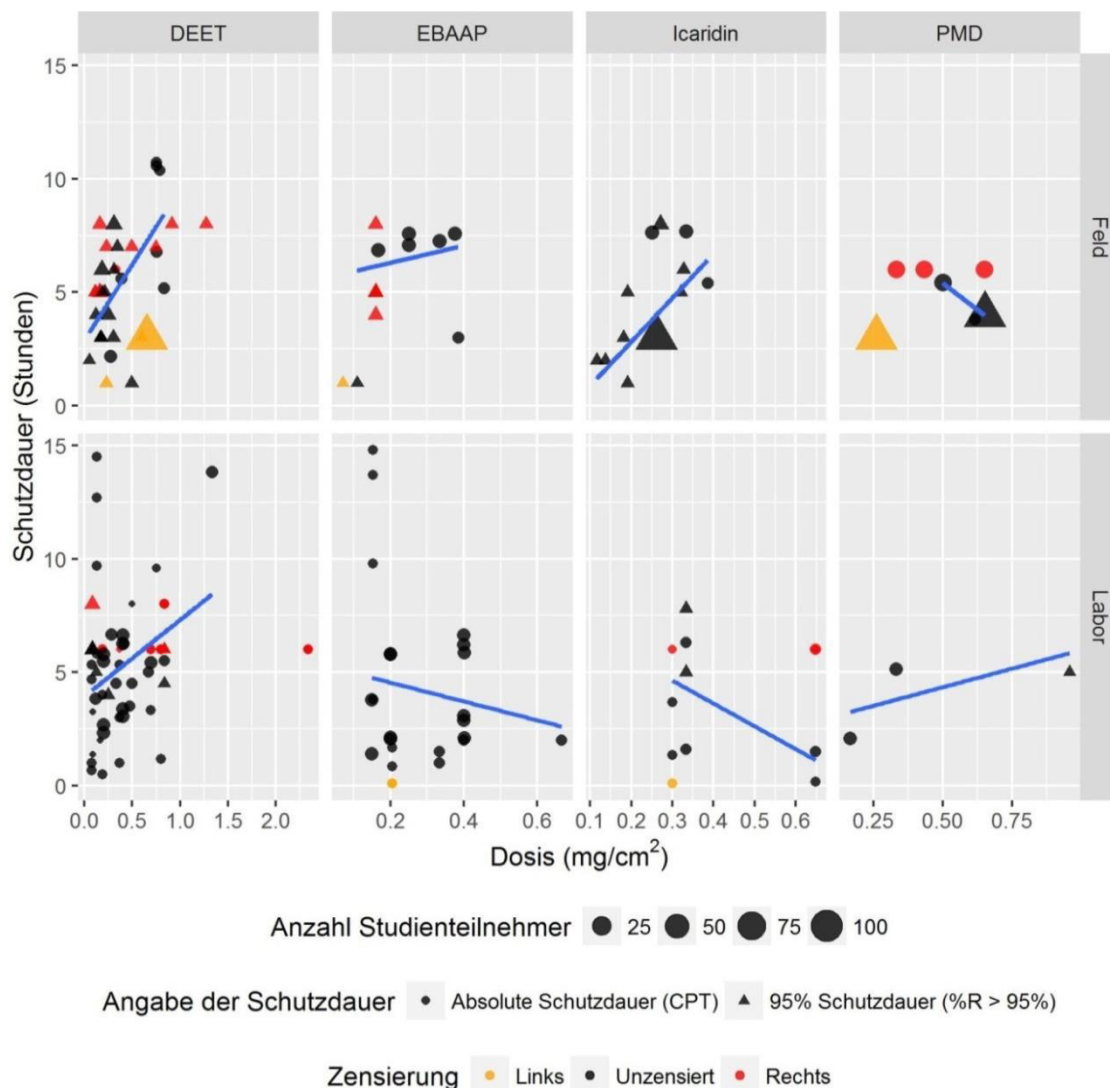


Abbildung 9: Schutzdauer in Abhängigkeit der Wirkstoffmenge. Die Symbole repräsentieren die Mittelwerte einzelner Experimente, aufgetrennt nach Formulierung und Mückenart. Die Absolute Schutzdauer entspricht der Dauer vom Auftragen des Mückenschutzmittels bis zum ersten Stich oder bis zum ersten, bestätigten Stich. Die 95% Schutzdauer ist die Zeitspanne während derer die relative Schutzwirkung mindestens 95% betrug. In zahlreichen Versuchen war die Schutzdauer zensiert. Damit ist gemeint, dass die effektive Schutzdauer entweder geringer (links zensiert) oder länger (rechts zensiert) als die angegebenen Werte war, jedoch diese nicht bestimmt wurden, z.B. wenn der Versuch nach 6 Stunden abgebrochen wurde, ohne dass es eine Landung/Stich gab. Die Größe der Symbole entspricht der Anzahl Studienteilnehmer in den einzelnen Versuchen. Die blauen Linien zeigen lineare Regressionsgeraden. Für die Berechnung der Regressionsgeraden wurde eine Gewichtung der Anzahl Studienteilnehmer vorgenommen sowie sämtliche zensierte Daten ausgeschlossen.

Die Grafik zeigt die Schutzdauer in Abhängigkeit der Wirkstoffmenge. Die Wirkstoffmenge wurde aufgrund der Angaben über den Wirkstoffgehalt in den Formulierungen sowie der aufgetragenen Menge berechnet. Die Schutzdauer wurde direkt den Publikationen entnommen. Häufig wurde diese entweder als mittlere CPT oder %R angegeben. Dort wo nur die %R über die Zeit beschrieben war, haben wir für die Auswertung denjenigen Zeitpunkt berücksichtigt, bei dem die %R noch mindestens 95% war.

Abbildung 9 verdeutlicht, wie gross die Streuung zwischen den einzelnen Studien ist. Neben den oben Aufgeführten Gründen waren nur 16 von insgesamt 175 getesteten Formulierungen reine Wirkstoffe bzw. in reinen Lösungen mit Ethanol. Alle anderen untersuchten Formulierungen sind entweder im Handel erhältlich oder wurden von den Herstellern den Wissenschaftlern zur Verfügung gestellt. Es ist denkbar, dass auch die Formulierung einen starken Einfluss auf die Schutzdauer der Produkte hat und diese zusätzlich zur beobachteten Streuung beiträgt.

Es fällt auf, dass wenig über die Wirksamkeit von PMD publiziert wurde. Während EBAAP und Icaridin in der Literatur etwas besser beschrieben sind, haben wir viele Angaben zu DEET. Einerseits ist DEET das am häufigsten verwendete Mückenschutzmittel und andererseits wird DEET oft als „Gold Standard“ in zahlreichen Studien mitgetestet. Bei DEET ist ein Zusammenhang zwischen der aufgetragenen Wirkstoffmenge und der Schutzdauer erkennbar. Allerdings ist auch hier die Streuung sehr gross. Schwer auszumachen ist, ob dieselbe Konzentration an Wirkstoff in der Anwendung im Feld einen längeren Schutz bietet oder nicht.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die publizierten Studien keinen deutlichen Zusammenhang zwischen Labor- und Feldversuchen erahnen lassen. Ein wesentlicher Grund dafür ist sicher die enorme Variabilität der Methoden und der Rahmenbedingungen, unter welchen die Studien durchgeführt wurden. Aus der Literaturstudie kommt auch hervor, dass wir relativ wenig über die eigentliche Aktivität der einzelnen Wirkstoffe wissen, da die meisten Versuche mit bereits formulierten Produkten durchgeführt wurden.

Tabelle 4: Publikationen in denen Feld- und Laborversuche direkt miteinander verglichen werden.

Labor						Feld				Labor vs. Feld	Source
Wirkstoff	Käfiggröße	Anzahl Mücken (Alter)	Mückenart	N	Schutzdauer	Wirkstoff	Mückenart	N	Schutzdauer		
DEET 10%, 20%, 30% MR08 10%, 20%, 30% <i>Ocimum suave</i> 10%	27'000 cm ³	N=25 (3 Tage)	<i>Cx. quinquefasciatus</i> <i>An. gambiae</i> s.s.	-	CPT ¹ %R	DEET 30% MR08 30%	97.3% <i>An. gambiae</i> 2.7% <i>Cx. quinquefasciatus</i>	10	PE	DEET und MR08 Konzentration zeigen eine ähnliche Schutzwirkung	Kweka, E.J. <i>et al.</i> (2012) [17]
DEET 20% SS220 20%	-	N=100 (6-9 Tage)	<i>Ae. aegypti</i> <i>An. farauti</i> <i>Cx. annulirostris</i>	1	CPT ²	Gleich wie Labor	84.5% <i>Cx. annulirostris</i>	3	%R	Im Labor wirkt DEET länger als SS220 und im Feld wirkt SS220 länger als DEET	Frances, S.P. <i>et al.</i> (2009) [18]
Kommerzielle Produkte: DEET 30%, 33.25%	-	N=750 (-)	<i>Ae. aegypti</i>	2	CPT ³	Gleich wie Labor	86% <i>Oc. sticticus</i> 13% <i>Ae. vexans</i>	5	CPT ³	Reduzierte CPT nach sportlicher Betätigung: von 468 auf 267 Min. im Labor und von 359 zu 203 Min. im Feld.	Schofield, S. <i>et al.</i> (2007) [19]
Kommerzielle Produkte: PMD 10%, 20% DEET 10%, 30%	91'125 cm ³	N=200 (3-4 Tage)	<i>Ae. aegypti</i>	1 - 9	CPT ⁴	Kommerzielle Produkte: PMD 20% (gleich wie Labor) sowie PMD 26% und DEET 20%	64% <i>Oc. melanimon</i> 32% <i>Ae. vexans</i> 3% <i>Oc. increpitus</i>	2-20	CPT ⁴	PMD und DEET zeigen eine ähnliche Schutzwirkung sowohl im Labor wie auch im Feld	Carroll, S.P. and Loye J. (2006) [6]
Kommerzielle und nicht erhältliche Formulierungen: DEET 3.0%, 6.9%, 12.6%, 31.6%, 34.6%, 80% EBAAP 7.5% Icaridin 9.3%, 19.1% Weitere Produkte	27'000 cm ³	N=100 (6-9 Tage)	<i>An. farauti</i> <i>Cx. annulirostris</i> <i>Ae. aegypti</i> <i>Oc. vigilax</i>	1-3	CPT	Kommerzielle und nicht erhältliche Formulierungen: DEET 6.9%, 12.6%, 80% Icaridin 9.3%, 19.1%	Test 1: 49.9% <i>Cx. annulirostris</i> 21.2% <i>Verrallina</i> sp. 15.9% <i>Oc. Vigilax</i> Test 2: 58.8% <i>Cx. annulirostris</i> 22.1% <i>Oc. vigilax</i>	4	%R ⁵	Formulierungen mit höheren DEET Konzentrationen zeigten die beste Wirkung, während die Icaridin-Formulierungen etwas weniger gut wirken. EBAAP wurde nur im Labor getestet und wirkte nur kurz.	Frances, S.P., <i>et al.</i> (2005) [20]

Labor						Feld				Labor vs. Feld	Source
Wirkstoff	Käfiggrösse	Anzahl Mücken (Alter)	Mückenart	N	Schutzdauer	Wirkstoff	Mückenart	N	Schutzdauer		
Kommerzielle Produkte: DEET 14.3% EBAAP 10%, 12%, 20% Ethanolische Lösungen: DEET 10%, 15%, 20%, 25% und weitere Formulierungen	27'000 cm ³	N=250 (5-7 Tage)	<i>Ae. aegypti</i>	4	CPT ³	Im Feld wurden nur Mischungen getestet, so dass ein direkter Vergleich nicht möglich ist.	32.7% <i>An. barbirostris</i> 28.5% <i>An. subalbatus</i> 12.8% <i>Ma. uniformis</i> 10.4% <i>An. gardnerii</i>	8	%R	Ein Vergleich zwischen Labor und Feld ist nicht möglich, da im Feld keine reinen Formulierungen getestet wurden. Im Labor zeigt DEET eine bessere Wirkung als EBAAP.	Tuetun, B. <i>et al.</i> (2005) [21]
5 pflanzliche Extrakte als Gel oder als Crème	(-)	N=250 (4-5 Tage)	<i>Cx quinquefasciatus</i> <i>Ae. aegypti</i> <i>An. dirus</i>	6	CPT	Auswahl der besten 2 Produkte aus dem Laborversuch plus DEET 20%	Rachathewi, Bangkok: 99.6% <i>Cx. quinquefasciatus</i> Toong Kru, Bangkok: 100% <i>Ae. Aegypti</i> Bang Bo, Samut Prakan: 86.1% <i>Ma. Uniformis</i> Sai Noi, Nonthaburi: 42.5% <i>Cx. sitiens</i> 27.4% <i>Cx. gelidus</i> 23.5% <i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	4	%R	Pflanzliche Gels schützen leicht besser (95.7%) als Gel mit DEET (82.7) bei Stunde 5.	Trongtokit, Y. <i>et al.</i> (2004) [22]
DEET 20% EBAAP 20%	27'000 cm ³	N=250 (-)	<i>Ae. aegypti</i> <i>Cx. quinquefasciatus</i> <i>Cx. tritaeniorhynchus</i> <i>An. dirus</i>	3	CPT ³	Gleich wie Labor	<i>Ae. albopictus</i> <i>Ar. subalbatus</i> <i>Cx. sitiens</i> <i>Ma. dives</i> <i>Cx. gelidus</i> <i>An. hyrcanus</i> Zusammensetzung der Arten unterscheidet sich nach Ort und Jahreszeit.	6	CPT	DEET und IR3535 bieten ähnlich guten Schutz im Feld und im Labor.	Thavara, U. <i>et al.</i> (2001) [23]

CPT: Absolute Schutzdauer (Engl. „mean protection time“); HLC: Landung auf Person (Engl. „human landing catch“); %R: Relative Schutzwirkung (Engl. „relative protection“) in %. ¹CPT entspricht hier der Zeit bis zur ersten Landung. ²CPT entspricht hier der Zeit bis zum dritten Stich. ³CPT entspricht hier der Zeit bis zum ersten, bestätigten Stich. ⁴CPT: erster, bestätigter Stich (d.h. ≥4 Stiche) innerhalb einer

30 Min. Exposition. ⁵Hier wird die Dauer, während derer der Schutz über 95% war angegeben.

Tabelle 5: Übersicht der Publikationen mit Feldversuchen.

Wirkstoff	Methode	Applikationsmenge	N	Mückenart	Schutzdauer	Resultat	Quelle
Kommerzielle Produkte: DEET 35%, 40%	HLC auf dem Unterschenkel	DEET 35%: 0.48±0.1 mg/cm ² DEET 40%: 0.77±0.1 mg/cm ²	1 Dame 2 Herren	40.4% <i>Cx. annulirostris</i> 36.8% <i>Ae. vigilax</i> 12.5% <i>Ma. uniformis</i>	%R	DEET 35% schützt während 3 Std. (%R > 95%) DEET 40% schützt während 6 Std. (%R > 95%)	Frances, S.P. (2013) [24]
Kommerzielles Produkt: DEET 15% sowie weitere Produkte mit diversen pflanzlichen Extrakten	HLC auf beiden Unterarmen (je ein anderes Produkt auf jedem Arm)	1 ml pro 550 cm ²	2 Damen 5 Herren	1. Sammlung: 94% <i>Psorophora columbiae</i> 2. Sammlung: 89% <i>Ps. columbiae</i>	CPT ¹	DEET 15% schützt während 130 Min. Die pflanzlichen Produkte waren gegenüber DEET 15% überlegen	Qualls, W.A. et al. (2011) [25]
Kommerzielle Produkte: Icaridin 20% PMD 20%, 50% DEET 50%	HLC auf dem Unterschenkel (Nur Stiche wurden gezählt)	Pro Unterschenkel 15 ml Repellent	33 Damen 67 Herren	32% <i>Anopheles</i> spp., davon 11% <i>An. gambiae</i> s.l. 31% <i>Culex</i> species 27.5% <i>Mansonia</i> spp. 0.2% <i>Aedes</i> spp. (0.2)	%R	Alle Repellentien zeigten eine ähnliche Schutzwirkung: 50% der Teilnehmenden hatten kompletten Schutz während 5 Std., 50% waren zu 90% geschützt. Obwohl statistisch nicht signifikant ($p = 0.07$), besteht ein Trend, dass DEET 50% dem PMD 20% überlegen ist.	Uzzan, B. et al. (2009) [15]
Kommerzielles Produkt: EBAAP 7.5% Nicht kommerzielles Produkt: DEET 34.6%	HLC auf dem Unterschenkel	Test 1: EBAAP 7.5%: 1.46±0.31 mg/cm ² DEET 34.6%: 2.15±0.67 mg/cm ² Test 2: EBAAP 7.5%: 0.94±0.22mg/cm ² DEET 34.6%: 0.54±0.07 mg/cm ²	3 Damen 3 Herren (Pro Test nur 3)	Test 1: 58.9% <i>Ma. uniformis</i> 33.4% <i>Cx. annulirostris</i> Test 2: 85.7% <i>Ae. vigilax</i>	%R	EBAAP 7.5% bietet während 1 Std. mindestens einen 95%Schutz gegen <i>Ma. uniformis</i> und <i>Cx. annulirostris</i> und mindestens 85% gegen <i>Ae. vigilax</i> . DEET 35% bietet während 5 Std. einen vollständigen Schutz gegen alle drei Mückenarten.	Frances, S.P. et al. (2009) [26]
Kommerzielle Produkte: DEET 30%, 31.58%, 33.33%	HLC auf dem Unterschenkel und dem Unterarm	1.5 g pro 600 cm ²	2 Damen 2 Herren	92% <i>Oc. sticticus</i> 5.2% <i>Ae. vexans</i>	CPT ¹	Unabhängig von der Formulierung zeigten alle Produkte eine ähnliche Schutzdauer von 623±107 bis 644±163 Min.	Schofield, S. et al. (2007) [27]

Wirkstoff	Methode	Applikationsmenge	N	Mückenart	Schutzdauer	Resultat	Quelle
Sprays mit EBAAP 10%, 15%, 20% Spray mit Icaridin 20% Lotion mit EBAAP 10%, 15% Lotion mit Icaridin 10%	HLC auf beiden Armen, ausgestreckt (1 Arm mit Repellent und 1 Arm als Kontrolle)	1.5 g Lotion oder 1 g Spray pro 600 cm ²	5 Damen 5 Herren	100% <i>Ae. aegypti</i>	%R und CPT	Ausser Lotion EBAAP 10% boten alle Formulierungen einen mindestens 95%-igen Schutz bis zur sechsten Stunde. Bei der Lotion EBAAP 10% viel die Schutzwirkung nach 4 Stunden unter 95%.	Naucke, T.J. <i>et al.</i> (2007) [28]
Studie A: DEET 15% Kombinationen aus PMD 15% oder 20% und Zitronengras Studie B: Kombination aus PMD 16% und Zitronengras DEET 20%	HLC auf Unterschenkel	0.002 ml/cm ²	Studie A: 5 Studie B: 3	Studie A: 55.6% <i>Psorophora varipes</i> 24.8% <i>Ae. ochlerotatus taeniorhynchus</i> Studie B: 86% <i>An. darlingi</i>	%R	Kombination aus PMD und Zitronengras schützt bis zu 6 Std. Studie A: DEET schützte > 92% während 5 Std. PMD/LG schützte >98% während 5 Std. Studie B: DEET schützte zu 62% während 6 Std. PMD/LG bot 95% Schutz für 6 Std.	Moore, S.J. <i>et al.</i> (2007) [29]
Kommerzielle Produkte: Icaridin 9.3% DEET 80% Mischung aus DEET 10% und andere Substanzen	HLC auf Unterschenkel	Icaridin 9.3: 1.48±0.26 mg/cm ² DEET 80%: 1.14±0.28 mg/cm ² DEET 10% Mix: 1.41±0.36 mg/cm ²	4 Herren	63.2% <i>Cx. annulirostris</i> 19.6% <i>Oc. normanensis</i> 8.6% <i>An. meraukensis</i>	%R	DEET 10% und 80% schützen länger als Icaridin 9.3%: <ul style="list-style-type: none"> Icaridin 9.3% schützt während 2 Std. (%R > 95%) DEET 10% schützt während 7 Std. (%R > 95%) DEET 80% schützt über 8 Std. (%R > 95%) 	Frances, S.P. <i>et al.</i> (2005) [30]
Kommerzielles Produkt: Icaridin 19.2% Nicht kommerzielle Formulierungen: DEET 20%, 35%	HLC auf Unterschenkel	Icaridin 9.3: 1.74±0.33 mg/cm ² DEET 20%: 1.33±0.14 mg/cm ² DEET 35%: 1.20±0.15 mg/cm ²	4 Herren	57.8% <i>Cx annulirostris</i> 15.4% <i>An. meraukensis</i> 13.2% <i>An. bancroftii</i>	%R	Geringer Schutz gegen <i>Anopheles</i> spp: <ul style="list-style-type: none"> Icaridin 19.2% und DEET 35% schützen während 1 Std. (%R > 95%) DEET 20% schützt weniger als 1 Std. (%R > 95%) Guter Schutz gegen <i>Cx. annulirostris</i> : <ul style="list-style-type: none"> Icaridin 19.2% schützt während 5 Std. (%R > 95%) DEET 20% und 35% schützen während 7 Std. (%R > 95%) 	Frances, S.P. <i>et al.</i> (2004) [31]

Wirkstoff	Methode	Applikationsmenge	N	Mückenart	Schutzdauer	Resultat	Quelle
Kommerzielle Produkte: Icaridin 9.3%, 19.2% DEET 20%, 33% Nicht kommerzielle Produkte: DEET 35%	HLC auf Unterschenkel	0.91 - 1.67 mg/cm ²	4 Herren	73.8% <i>Verrallina lineata</i> 6.9% <i>Oc. kochi</i> 6.7% <i>An. farauti</i> s.s. 6.1% <i>Oc. notoscriptus</i>	%R	Icaridin 9.3% schützt während 2 Std. (%R > 95%) Icaridin 19.2% schützt während 9 Std. (%R > 94.7%) DEET 20% schützt (nur am Tag) während 6 Std. (%R > 95%) DEET 33% schützt (nur am Tag) während mindestens 8 Std. (%R > 95%) DEET 35% schützt während 7 Std. (%R > 95%)	Frances, S.P. <i>et al.</i> (2002) [32]
Nicht kommerzielle Formulierungen: DEET 25% EBAAP 25% Icaridin 25% PMD 40%	HLC auf Unterarm	1 ml pro 650 cm ²	5 Herren	<i>Oc. taeniorhynchus</i>	%R und CPT	Mittlere CPT für EBAAP 25% ist 3 Std, für Icaridin 25% 5.4 Std., für PMD 40% 3.8 Std. und für DEET 25% 5.6 Std. Bei allen Formulierungen war der relative Schutz auch nach 7 Stunden noch mindestens bei 60%.	Barnard D.R. <i>et al.</i> (2002) [33]
Wirkstoffe (unverdünnt) DEET AI3-37220 DEET + AI3-37220 (1:1)	HLC auf Unterarm in 2er Gruppen	0.25 mg/cm ²	2 Damen 4 Herren	<i>Ae. communis</i>	%R	Alle 3 Wirkstoffe bieten während 4 Std. einen Schutz von mindestens 95%. Nach 6 Std. ist %R von DEET unter 90% und bei AI3-37220 noch über 95%. Die Kombination der beiden Wirkstoffe war nicht besser als die Wirkstoffe alleine.	Debboun, M. <i>et al.</i> (2000) [34]

CPT: Absolute Schutzdauer (Engl. „mean protection time“); HLC: Landung auf Person (Engl. „human landing catch“); %R: Relative Schutzwirkung (Engl. „relative protection“) in %. ¹CPT entspricht hier der Zeit bis zum ersten, bestätigten Stich.

Tabelle 6: Übersicht der Publikationen mit Laborversuchen.

Wirkstoff	Methode	Anzahl Mücken (Alter)	Mückenart	N	Schutzdauer	Resultat	Quelle
Nicht kommerzielle Formulierungen: DEET 10% Div. Semiochemicals	Käfigtest (125'000 cm ²)	N=50	<i>An. gambiae</i> s.s. <i>Cx. quinquefasciatus</i> <i>Ae. aegypti</i>	6	%R	<i>An. gambiae</i> s.s.: DEET 10% bot eine %R von 100% bis zu 6 Stunden, danach 94% bis zur Stunde 8 <i>Cx. quinquefasciatus</i> : DEET 10% bot eine %R von 100% bis zu 6 Stunden, danach 93% bis zur Stunde 8 <i>Aedes aegypti</i> : DEET 10% bot eine %R von 100% bis zu 6 Stunden, danach >96% bis zur Stunde 8	Logan et al. 2010 [35]
Kommerzielle Produkte: DEET 7%, 17%, 80% Mit und ohne Sonnenschutz (SPF 30)	Käfigtest (36'000 cm ³)	N=50 (3-7 Tage)	<i>Ae. aegypti</i>	6	CPT ¹	DEET 7% (mit oder ohne Sonnenschutz): 230±18.4 Min. bzw. 240±15.5 Min. (Mittelwert ± Standardfehler) DEET 17% (mit oder ohne Sonnenschutz): 330±25.2 Min. bzw. 400±12.7 Min. (Mittelwert ± Standardfehler) DEET 80% (mit oder ohne Sonnenschutz): 770±54.8 Min. bzw. 830±20.2 Min (Mittelwert ± Standardfehler)	Webb, C. E. et al. (2009) [36]
Nicht kommerzielle Formulierungen: DEET und EBBAP 10%, 20% als Crème und als Sprays Div. kommerzielle Formulierung mit EBAAP 7.5% (3 verschiedene Produkte mit und ohne Sonnencreme), 20%	Käfigtest (21'458 cm ³)	N=50 (6-10 Tage)	<i>Ae. aegypti</i> <i>Cx. quinquefasciatus</i>	5 Damen 3 Herren	CPT ²	Wirkung von DEET und EBAAP vergleichbar, wobei 20% Formulierungen besser wirkten (<i>Ae. aegypti</i> : 3 Std. und <i>Cx. quinquefasciatus</i> : 6 Std.)	Cilek, J. E. et al. (2004) [37]
Kommerzielle Produkte: DEET 4.75%, 6.65%, 20%, 23.8% EBAAP 7.5% Div. pflanzliche Repellentien Armbänder Feuchtigkeitsscrème	Käfigtest (14'520 cm ³)	N=10 (7-24 Tage)	<i>Ae. aegypti</i>	10 Damen 5 Herren	CPT ³	Die DEET Formulierung schützten länger vor Mückenstichen als die EBAAP Formulierung. Die Schutzzeiten korrelieren mit der DEET Konzentration: EBAAP 7.5%: 22.9 Min. DEET 4.75%: 88.4 Min. DEET 6.65%: 112.4 Min. DEET 23.8%: 301.5 Min. DEET 20.0%: 234.4 Min. Armbänder mit DEET boten keinen Schutz.	Fradin, M. S. et al. (2002) [38] ^A

Nicht kommerzielle Formulierung: Icaridin 20%	Unterschiedliche Käfigtests: BG Käfig (27'000 cm ³) Standardkäfig (91'125 cm ³)	N=30 N=200	<i>Ae. aegypti</i>	4	CPT ³ und %R	Dieselbe Formulierung ergibt einen länger anhaltenden Schutz im BG Käfig gegenüber dem konventionellen Käfig. CPT = 6.3±0.6 Std. (BG Käfig) und 1.6±0.2 Std. (Konventioneller Käfig) bzw. Dauer für %R>95% = 7.8±0.1 Std. (BG Käfig) und 5.0±0.2 Std. (Konventioneller Käfig)	Obermayr, U. <i>et al.</i> (2010) [39]
Nicht kommerzielle Formulierungen: DEET 25% (mit und ohne Vanillin) Diverse pflanzliche Extrakte	Käfigtest (64'000 cm ³) Raumtest mit Unterschrank (108 m ³)	N=250 (3-5 Tage) Sowohl im Käfigtest wie auch im Raumtest	<i>Ae. aegypti</i> <i>An. dirus</i> <i>Cx. quinquefasciatus</i>	3	CPT ² (Käfigtest) und %R (Raumtest)	Die Schutzwirkung von DEET ist bei 6 Std. noch 100% bei <i>Ae. aegypti</i> und <i>Cx. quinquefasciatus</i> und bei <i>An. dirus</i> noch 58.3% Pflanzliche Wirkstoffe mit Vanillin könnte DEET ersetzen.	Tawatsin <i>et al.</i> (2001) [40]
Kommerzielle Produkte: DEET 15% Tüchlein mit 0.574 g PMD Formulierung mit pflanzlichen Extrakten	Käfigtest (64'000 cm ³)	N=200	<i>An. arabiensis</i>	3 Herren	%R	Alle 3 Repellentien bieten einen absoluten Schutz für 4-5 Std.	Govere <i>et al.</i> (2000) [41]
Nicht kommerzielle Formulierungen: DEET 25% Pflanzliche Extrakte 50%	Käfigtest (125'000 cm ³)	N=150-170	<i>An. stephensi</i>	4	CPT ²	Die mittlere Schutzdauer von DEET 25% war 6.25 Std. und war den pflanzlichen Extrakten überlegen.	Tavassoli, M. <i>et al.</i> (2011) [42]
Nicht kommerzielle Formulierungen: DEET 15% Pflanzliche Extrakte 10%, 20%	Käfigtest (Keine Angabe)	N=50	<i>An. arabiensis</i>	4	%R	DEET bot mit 4 Stunden (%R > 95%) einen längeren Schutz als die pflanzlichen Extrakte.	Solomon, B. <i>et al.</i> (2012) [43]

CPT: Absolute Schutzdauer (Engl. „mean protection time“); HLC: Landung auf Person (Engl. „human landing catch“); %R: Relative Schutzwirkung (Engl. „relative protection“) in %. ¹N,N-diethyl phenylacetamide. ¹CPT entspricht hier der Zeit bis zum dritten Stich. ²CPT entspricht hier der Zeit bis zum ersten, bestätigten Stich. ³CPT entspricht hier der Zeit bis zum ersten (unbestätigten) Stich. ⁴Nicht in Meta-Analyse aufgenommen, da keine Applikationsmengen angegeben wurden.

3.2 Vergleichende Studie von Labor- und Feldmethoden zur Messung der Wirkungsdauer von Mückenschutzmitteln

3.2.1 Absolute Schutzdauer (CPT)

Die absolute Schutzdauer (Engl. „complete protection time“ bzw. „CPT“) entspricht in unserer Studie der Zeitdauer von der Applikation der Formulierung bis zum Intervall, in welchem die erste Mückenlandung erfolgt.

Die CPT Werte im Feld waren deutlich höher als in den Laborexperimenten, sowohl bei den Behandlungen mit einem der beiden Repellentien, DEET 15% oder PMD 15%, als auch in der Negativkontrolle (Abbildung 10). Im Feld zählten viele der Studienteilnehmerinnen und Studienteilnehmer während der gesamten Expositionszeit von 6 Stunden keine einzige Landung. Im Gegensatz dazu erfolgte in sämtlichen Käfigversuchen eine Landung innerhalb von 6 Stunden.

Bei Betrachtung der mittleren CPT (Median) konnte im Feld zwischen DEET 15% und PMD 15% kein Unterschied festgestellt werden (Abbildung 11 und Tabelle 7). Allerdings kann durch die vielen zensurierten Daten (Abbildung 10) nicht ausgeschlossen werden, dass die eine oder die andere Formulierung auch im Feld eine höhere mittlere CPT zeigen würde, wären die Messungen über einen längeren Zeitraum durchgeführt worden. Eine Spekulation ist, dass PMD 15% evtl. weniger lang als DEET 15% anhält, da die entsprechenden CPT Werte für PMD 15% etwas geringer waren (Abbildung 10).

Tabelle 7: Mittlere absolute Schutzdauer (CPT) von DEET 15% und PMD 15% unter Feld- und Laborbedingungen.

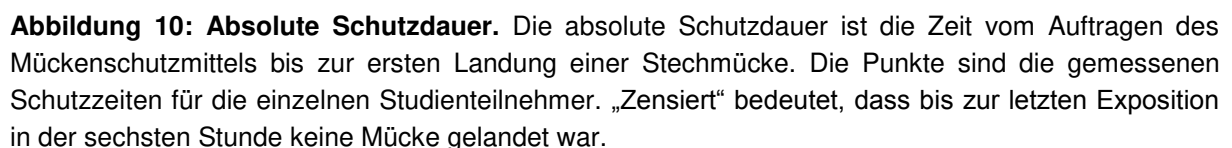
Experiment	N	DEET 15% (Stunden) ¹	PMD 15% (Stunden) ¹	χ^2	p-Wert ²
Feld AG	17	> 6 [-]	> 6 [-]	0.0	1.0
Feld ZH	16	> 6 [-]	> 6 [-]	0.0	0.563
Labor Aedes	17	0.5 [-]	0.5 [-]	0.3	< 0.05
Labor Anopheles	17	2.0 [1.0 – 3.0]	0.5 [0.5 – 1.0]	0.3	< 0.05
Labor Culex	17	2.0 [1.5 – 3.5]	1.0 [0.5 – 1.0]	5.0	0.052

¹ Die absolute Schutzdauer ist hier als Median inkl. 95% Konfidenzintervall angegeben. [-] bedeutet, dass das 95% Konfidenzintervall mangels Variation oder zensurierten Daten nicht berechnet werden konnte. ² Der p-Wert gibt an, ob der gemessene Unterschied zwischen DEET 15% und PMD 15% statistisch signifikant ist.

Im Vergleich zu den Laborexperimenten landeten in den Feldversuchen auch in der Kontrolle insgesamt weniger Mücken. Trotzdem war der Schutz durch DEET 15% und PMD 15% mit einer mittleren CPT von mindestens 6 Stunden (Tabelle 7) im Vergleich zur Kontrolle sowohl im Langholz AG (CPT = 4 Std.; $\chi^2 = 17.6$, df = 2, p-Wert < 0.001), als auch in den Thurauen ZH (CPT = 3 Std.; $\chi^2 = 23.2$, df=2, p-Wert < 0.0001) dennoch signifikant höher.

Während im Feld eine Bestimmung der CPT oft nicht möglich war, weil die Repellentien auch nach 6 Stunden noch wirksam waren, konnte die CPT in den Laborversuchen immer gemessen werden. In den Laborversuchen mit *An. stephensi* liess der Schutz durch PMD 15% ge-

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Repellentien im Feld eine länger anhaltende Wirkung als in den Käfigtests zeigten und im Labor PMD 15% tendenziell schlechter als DEET 15% abschnitt.



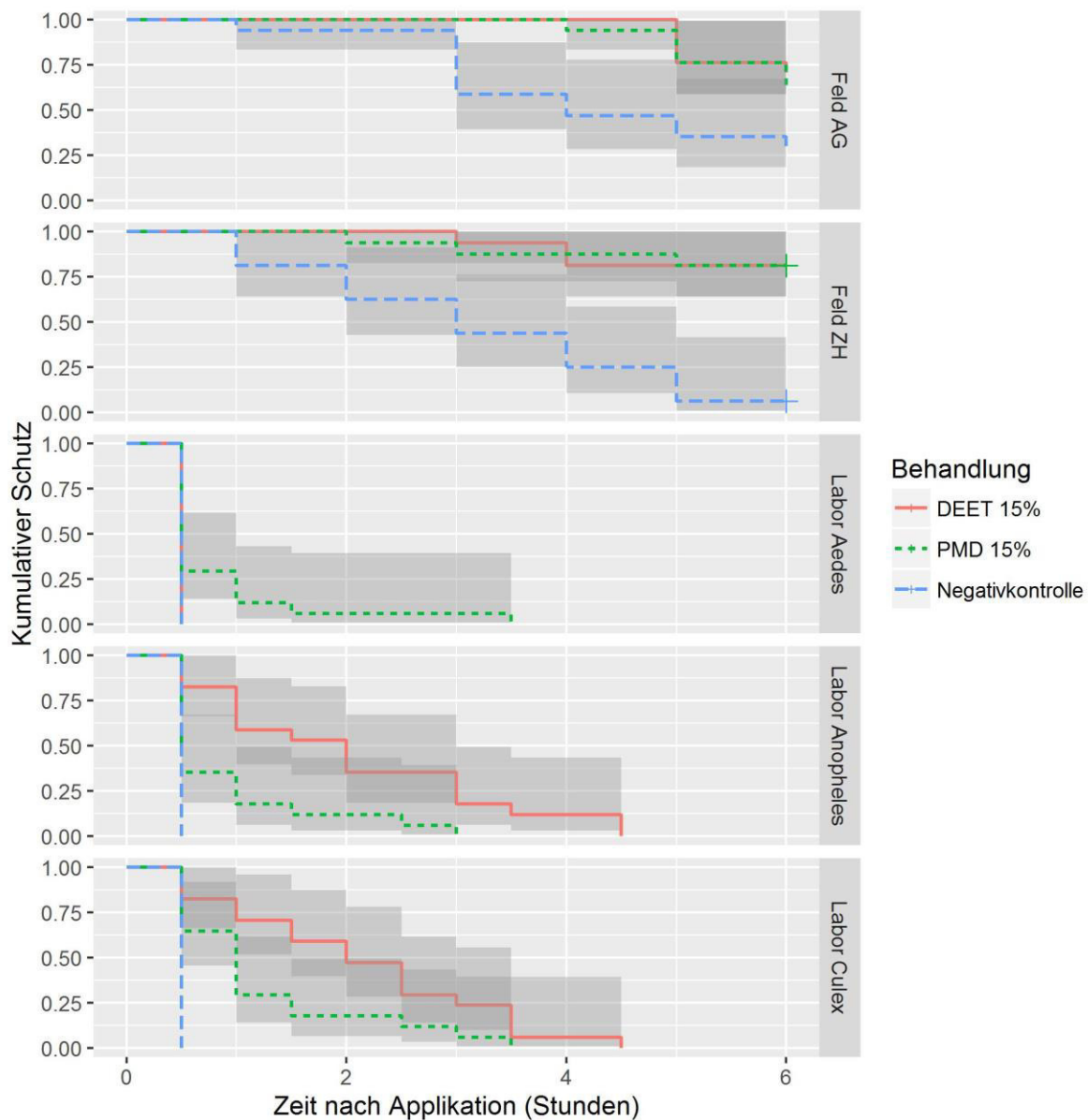


Abbildung 11: Überlebenszeitanalyse der absoluten Schutzdauer. Die Kurven zeigen den kumulativen Schutz in Abhängigkeit der Zeit nach der Applikation und die grau-schattierten Flächen entsprechen den 95% Konfidenzintervallen.

3.2.2 Relative Schutzwirkung (%R)

Die relative Schutzwirkung (%R) wurde aufgrund der gemessenen Landerate in den Behandlungen und den Kontrollen mit Hilfe der entsprechenden statistischen Modellen (d.h. den GLMs) geschätzt.

Im Labor war *Ae. aegypti* eindeutig die aggressivste Art mit einer Landerate in den Negativkontrollen von 1.68 (1.37 - 1.99) Landungen pro Sekunde (Mittelwert und 95% Konfidenzintervall), gefolgt von *An. stephensi* mit 0.543 (0.454 - 0.632) Landungen pro Sekunde und *Cx. quinquefasciatus* mit 0.306 (0.26 - 0.351) Landungen pro Sekunde (Abbildung 13).

Generell waren die Landeraten im Feld gegenüber denjenigen im Labor um ein tausendfaches geringer (Abbildung 12). Im Feld bewegten sich die Landeraten in den Negativkontroll-

len bei 0.0000853 (0.0000374 - 0.000191) Landungen pro Sekunde in Ellikon am Rhein ZH und bei 0.000062 (0.000027 - 0.000142) Landungen pro Sekunde in Rothrist AG. Diese Landeraten sind sehr gering im Vergleich zu publizierten Versuchen wie z.B. Schofield *et al.* [27] oder Carroll und Loye [6]. Normalerweise würde man auch in Rothrist und Ellikon am Rhein viele Stechmücken erwarten, jedoch war das Jahr 2015 ein aussergewöhnlich trockenes Jahr [44] und damit waren auch die Stechmückenzahlen im Sommer deutlich tiefer.

Während die Landeraten jeweils vor und nach den Laborversuchen ähnlich waren (Abbildung 13), stieg im Feld die Landerate in den Kontrollen gegen Ende der Versuche merklich an (Abbildung 12). Vermutlich waren die lokalen Stechmücken vorwiegend während der Dämmerung und in der Nacht aktiv. Die Landeraten bilden die Basis zur Berechnung des relativen Schutzes gemäss der Formel.

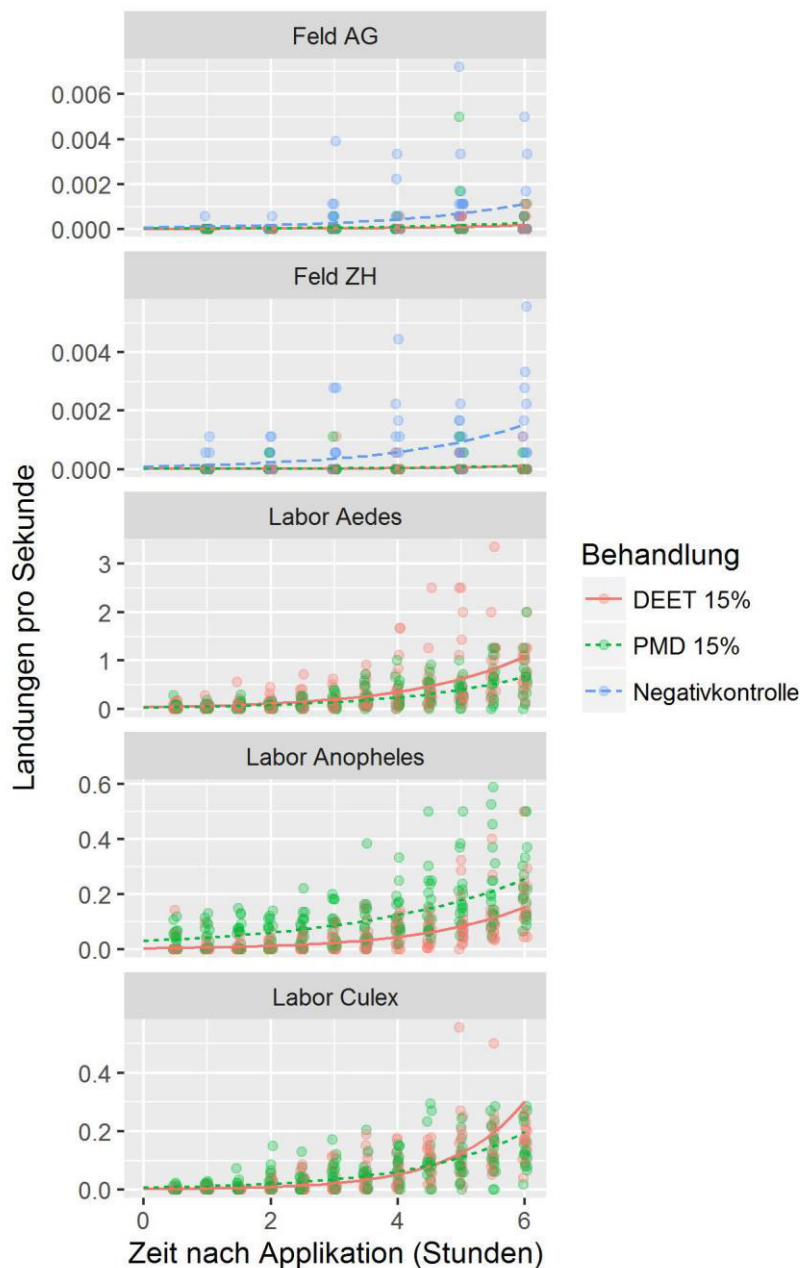


Abbildung 12. Landerate in Abhängigkeit der Zeit nach der Applikation. Die einzelnen Punkte zeigen die Messwerte für jede/n der 17 Studienteilnehmerinnen und Studienteilnehmer. Die Linien repräsentieren die geschätzte durchschnittliche Landerate aufgrund der statistischen Modelle (siehe Text). Während DEET 15% und PMD 15% einen unterschiedlich guten Schutz gegen Mückenstiche im Labor bot, konnte im Feld zwischen den beiden Repellentien kein Unterschied festgestellt werden.

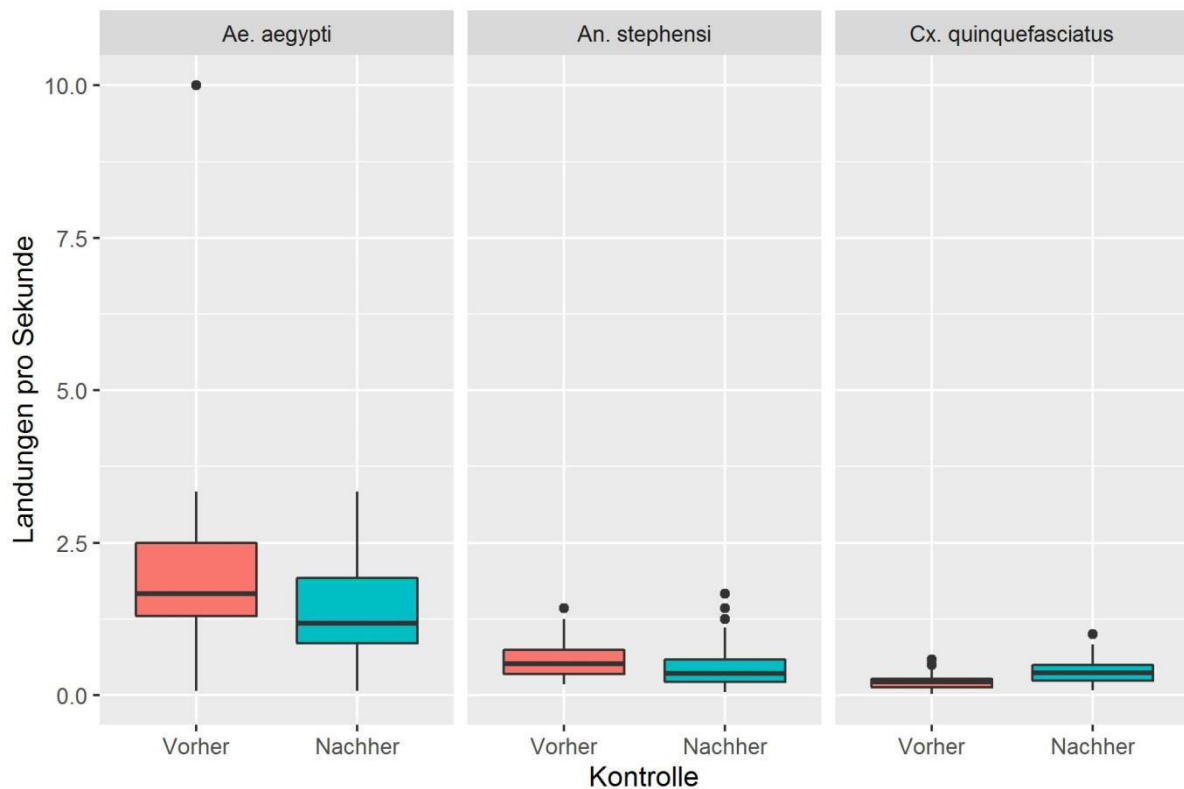


Abbildung 13. Landerate in den Kontrollen der Käfigversuche. Im Käfigtest wurde jeweils vor und nach dem eigentlichen Versuch eine Negativkontrolle am unbehandelten Unterarm durchgeführt. Dabei zeigte *Ae. aegypti* die höchste Landerate und war somit die aggressivste der drei Arten.

Tabelle 8. Modell zur Schätzung der durchschnittlichen Landerate im Feldversuch.

Parameter	Koeffizient β (\log_2)	SE (β) (\log_2)	Z-Wert	P-Wert
(Achsenabschnitt)	-9.378	0.416	-22.542	< 0.001
Ort (Rothrist)	-0.310	0.299	-1.037	0.3
Behandlung (DEET)	-4.035	1.306	-3.090	< 0.01
Behandlung (PMD)	-3.133	1.024	-3.061	< 0.01
Zeit (nach Applikation)	0.483	0.092	5.254	< 0.001
Interaktion: Ort (Rothrist) x Behandlung (DEET)	0.779	0.667	1.167	0.243
Interaktion: Ort (Rothrist) x Behandlung (PMD)	1.159	0.606	1.914	0.056
Interaktion: Behandlung (DEET) x Zeit	0.235	0.250	0.941	0.347
Interaktion: Behandlung (PMD) x Zeit	0.101	0.199	0.506	0.613

β : Regressionskoeffizient; SE(β): Mittlerer Fehler (Englisch: „Standard error“) von β . Z-Wert: standardisierte, dimensionslose Prüfstatistik. P-Wert: Überschreitungswahrscheinlichkeit der aus den Daten berechneten Prüfstatistik (Z). Der Achsenabschnitt entspricht der Referenz, d.h. die Anzahl Landungen in der Negativkontrolle in Ellikon am Rhein.

In Übereinstimmung mit der CPT war der Unterschied in den Landeraten bzw. in der %R zwischen DEET 15% und PMD 15% im Feldversuch statistisch nicht signifikant ($p = 0.3836$; Tabelle 8).

Im Gegensatz zur CPT liess bei *Ae. aegypti* der Schutz von DEET 15% gegenüber PMD 15% rascher nach, während es bei *An. stephensi* und *Cx. quinquefasciatus* länger dauerte, bis DEET 15% unter die 95% Marke fiel (Abbildung 14 und Tabelle 10).

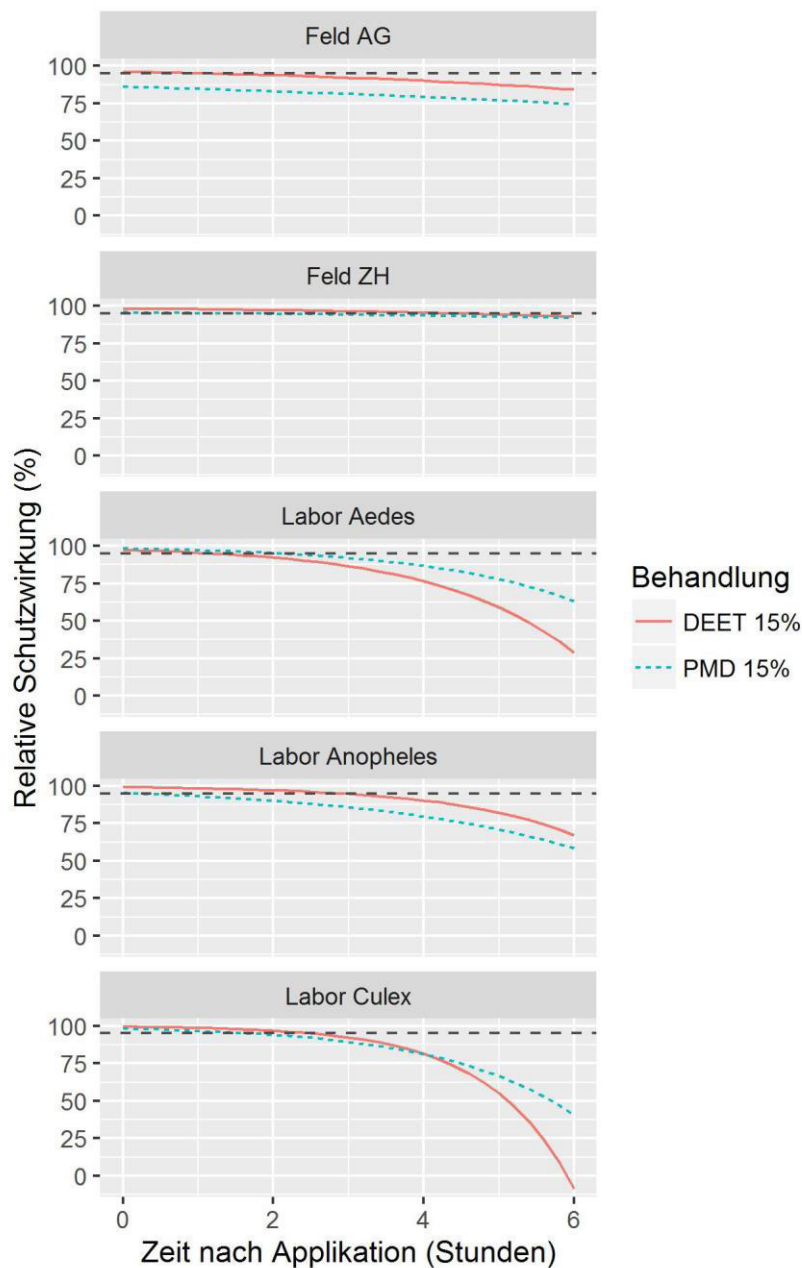


Abbildung 14. Verlauf der relativen Schutzwirkung (%R) nach Applikation der Behandlung. Siehe Material und Methoden, Abschnitt 2.2.7, für die Berechnung von %R. Die gestrichelte Linie markiert %R = 95%.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich bei der %R ein ähnliches Bild abzeichnet, wie bei der CPT, indem einerseits beide Formulierungen im Feld einen längeren Schutz zeigten als im Labor und DEET 15% insgesamt dem PMD 15% in seiner Schutzwirkung und Schutzdauer überlegen war. Die längere Schutzdauer im Feld hängt sehr wahrscheinlich mit der vielfach geringeren Landerate zusammen.

Frühere Studien, die PMD und DEET gegeneinander verglichen, kamen zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen. So zeigte die Arbeit von Carroll und Loye [6] eine ähnliche Schutzdauer für PMD und DEET sowohl unter Labor- wie auch unter Feldbedingungen. Moore *et al.* [45] verglich in einem 4-stündigen Test DEET 30% mit DEET 15% und fand eine %R von 97% gegenüber 85%. Schliesslich schien DEET dem PMD in einer Studie von Barnard *et al.* [33] leicht überlegen zu sein, allerdings war der Unterschied statistisch nicht signifikant.

Tabelle 9. Übersicht Modell zur Schätzung der durchschnittlichen Lande-rate im Laborversuch.

Parameter	β (\log_2)	SE(β) (\log_2)	Z-Wert	P-Wert
(Achsenabschnitt)	-3.239	0.150	-21.627	< 0.001
Behandlung (PMD)	-0.195	0.213	-0.919	0.358
Art (<i>An. stephensi</i>)	-2.288	0.235	-9.735	< 0.001
Art (<i>Cx. quinquefasciatus</i>)	-3.253	0.253	-12.871	< 0.001
Zeit (nach Applikation)	0.554	0.041	13.671	< 0.001
Interaktion: Behandlung (PMD) x Art (<i>An. stephensi</i>)	2.217	0.318	6.977	< 0.001
Interaktion: Behandlung (PMD) x Art (<i>Cx. quinquefasciatus</i>)	1.615	0.340	4.755	< 0.001
Interaktion: Behandlung (PMD) x Zeit	-0.048	0.057	-0.832	0.405
Interaktion: Art (<i>An. stephensi</i>) x Zeit	0.056	0.061	0.914	0.361
Interaktion: Art (<i>Cx. quinquefasciatus</i>) x Zeit	0.329	0.064	5.121	< 0.001
Interaktion: Behandlung (PMD) x Art (<i>An. stephensi</i>) x Zeit	-0.206	0.084	-2.441	0.015
Interaktion: Behandlung (PMD) x Art (<i>Cx. quinquefasciatus</i>) x Zeit	-0.261	0.088	-2.961	< 0.01

β : Regressionskoeffizient; SE(β): Mittlerer Fehler (Englisch: „Standard error“) von β . Z-Wert: standardisierte, dimensionslose Prüfstatistik. P-Wert: Überschreitungswahrscheinlichkeit der aus den Daten berechneten Prüfstatistik (Z).

Tabelle 10: 95% Schutzdauer.

Test	DEET 15% (Minuten)	PMD 15% (Minuten)
Field AG	67	0 ¹
Field ZH	266	82
Lab Aedes	73	124
Lab Anopheles	176	4
Lab Culex	151	102

Die 95% Schutzdauer ist die Zeit von der Applikation bis zum Zeitpunkt, bei dem der Schutz unter 95% fiel. ¹ Der geschätzte, relative Schutz (%R) war während der gesamten Versuchsdauer immer unter 95%.

3.2.3 Artenzusammensetzung der Stechmücken im Feld

Insgesamt wurden von den Studienteilnehmerinnen und Studienteilnehmer 9 verschiedene Stechmückenarten eingefangen. Während in Rothrist (AG) die Verteilung der Arten relativ ausgeglichen war, wurden in Ellikon am Rhein (ZH) vor allem *Aedes vexans* eingefangen. Diese Beobachtungen stimmen mit den Erwartungen überein, denn in einer früheren Studie wurde in Rothrist (AG) bereits ein sehr breites Artenspektrum gefunden [7] und die Thuraue in Ellikon am Rhein (ZH) sind ein typisches Schwemmgebiet und so ein ideales Habitat für Überschwemmungsmücke *Ae. vexans* und *Ae. cinereus* [9].

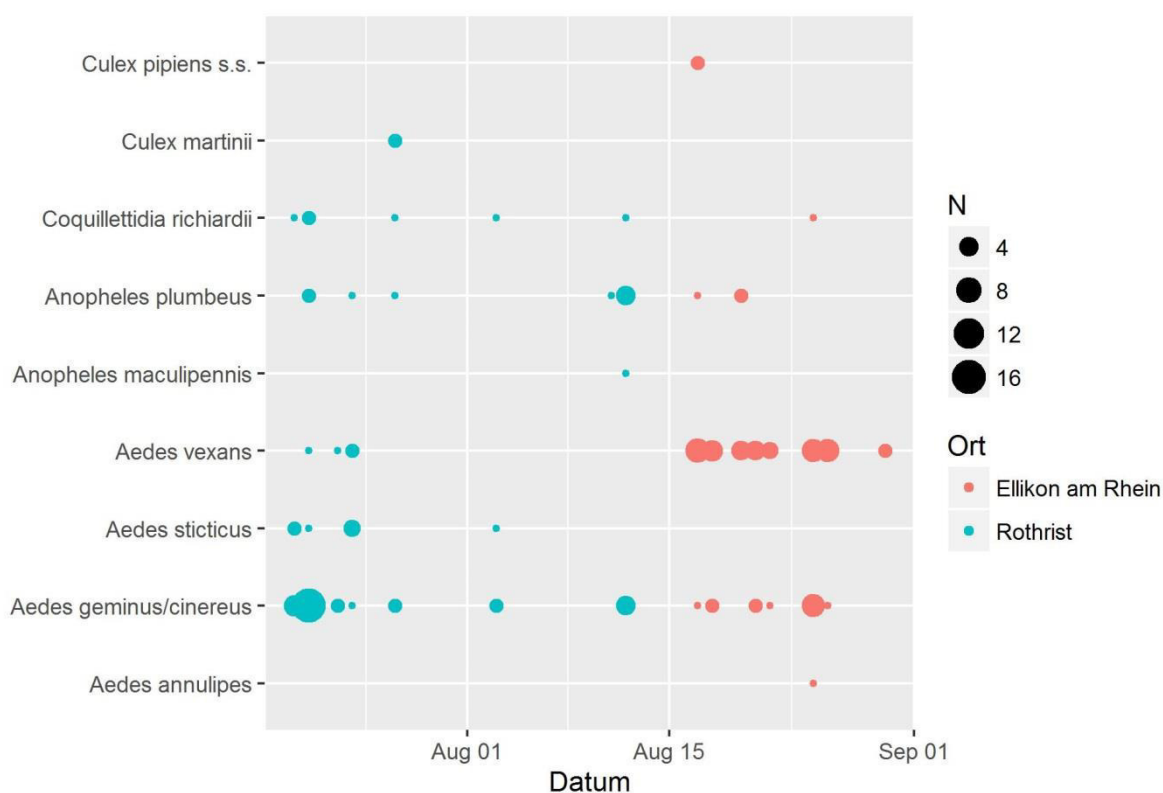


Abbildung 15: Stechmückenarten, die während den Feldversuchen auf dem exponierten Unterschenkel der Studienteilnehmer gelandet sind. Die Grösse der Symbole entspricht der Anzahl gelandeter Stechmücken.

Zusätzlich zu den HLCs in den Feldversuchen fingen die zusätzlich aufgestellten Fallen noch 3 weitere Arten: *Cs. galphyroptera*, *Coquilletidia richiardii* und *An. claviger*. Im Vergleich zur BG Sentinel Falle schien die CDC Miniature Light Trap ein breiteres Artenspektrum einzufangen.

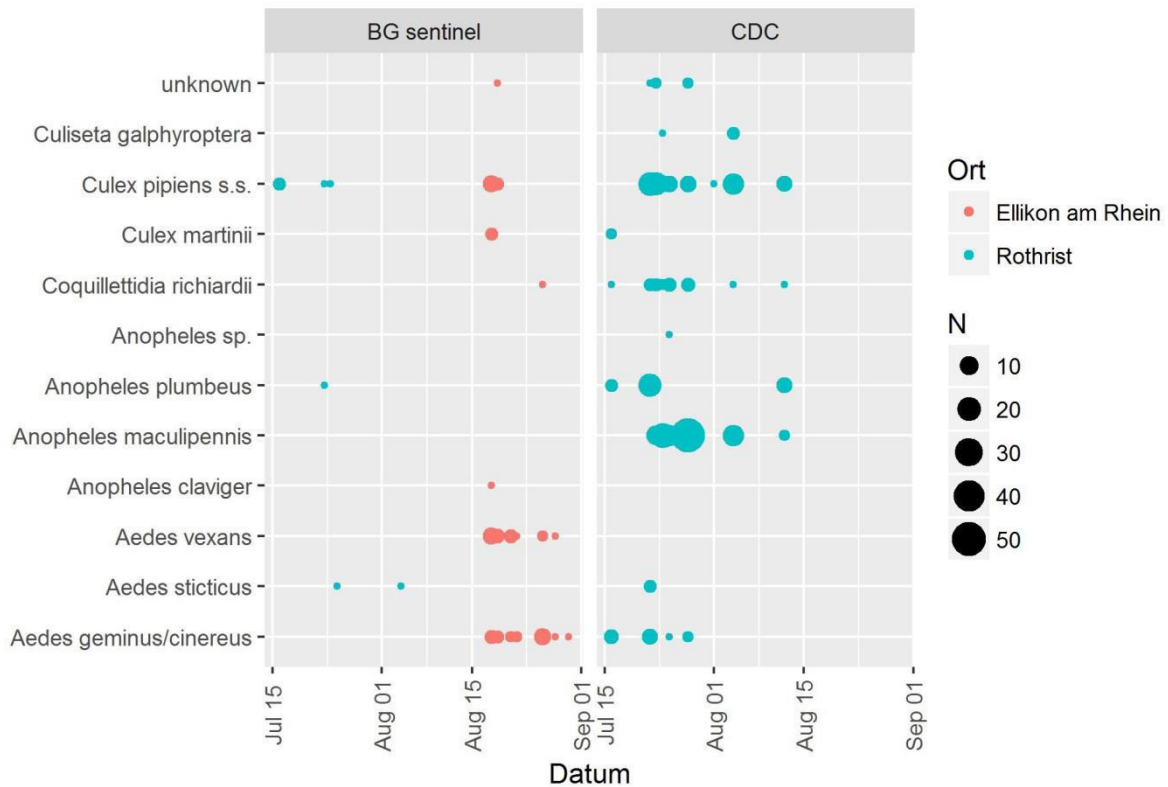


Abbildung 16: In den Fallen gesammelten Stechmückenarten. Die BG Sentinel Fallen (BG sentinel) und den CDC Miniature Light Traps (CDC) wurden jeweils am Abend vor den Versuchen aufgestellt. Da die CDC Fallen mit Trockeneis ausgerüstet werden müssen und in Ellikon am Rhein kein Trockeneis bezogen werden konnte, wurden diese Fallen dort nicht eingesetzt.

4 Schlussfolgerungen und Empfehlungen

Die Daten aus der Literaturanalyse zeigen keinen klaren Zusammenhang zwischen Labor- und Feldversuchen. Ein Hindernis für die Analyse ist die enorme Variabilität der Methoden und der Rahmenbedingungen, unter welchen die Studien durchgeführt wurden. Trotz den Empfehlungen der WHO und der EPA sind die Methoden der einzelnen Studien so unterschiedlich, dass sich die Ergebnisse aus den Studien kaum vergleichen lassen.

Während in den meisten Studien kommerziell erhältliche Formulierungen getestet wurden, ist relativ wenig über die Aktivität von einzelnen Wirkstoffen bekannt. Eine Ausnahme ist vielleicht die Beobachtung, dass generell ein höherer Wirkstoffanteil zu einer längeren Schutzzeit führt.

Selbst wenn die Bedingungen möglichst standardisiert werden, ist es schwierig aus den Labordaten genaue Vorhersagen für die Anwendung im Feld zu machen. Die Laborversuche werden meist unter extremen Bedingungen mit sehr hohen Stech- bzw. Landeraten der Mücken durchgeführt und so kann wohl davon ausgegangen werden, dass ein Wirkstoff bzw. eine Formulierung, die unter Laborbedingungen gute Resultate zeigt, auch unter realen Bedingungen einen guten Schutz bietet. Allerdings wäre es für den Reisenden wichtig zu wissen, welcher Wirkstoff gegen welche Stechmückenart am besten schützt, um sich optimal auf eine bevorstehende Reise vorbereiten zu können und das passende Produkt für die Mücken vor Ort in der Tasche zu haben.

Trotz der Literaturstudie und den eigenen Versuchen fehlt uns weiterhin das grundlegende Verständnis, in wie weit ein Käfigtest die natürliche Situation im Feld tatsächlich abbildet. Dazu wäre es hilfreich, neben den Endpunkten wie CPT und %R, auch das Verhalten während den Versuchen aufzuzeichnen, um herauszufinden, ob die Art und Weise, wie uns Mücken finden, in den Käfigtests den natürlichen Bedingungen nahe kommen oder nicht. Mit einem besseren Verständnis für das Verhalten der Mücken könnten allenfalls Lücken in dieser Methode aufgedeckt werden und so der Käfigtest optimiert werden.

Aus der vorliegenden Arbeit kommt auch hervor, dass wir wenig über die vergleichende Wirkung von DEET, Icaridin, EBAAP und PMD wissen. Viele kommerziell erhältliche Produkte enthalten zudem mehr als einen dieser Wirkstoffe, Parfüme und weitere Inhaltsstoffe, welche sehr wahrscheinlich ebenfalls Einfluss auf die Wirkung des Produkts haben. Dazu wäre es sinnvoll, unter denselben Bedingungen eine Dosis-Wirksamkeits-Studie durchzuführen, damit die vier Wirkstoffe einmal objektiv gegeneinander verglichen werden.

5 Dank

Wir danken Stefanie Strauch für die Begleitung des Projekts auf der Seite des Bundeamts für Gesundheit. Ein grosser Dank geht an Herrn Marcel Murri, Abteilung Wald des Kantons Aargau für die Organisation der Bewilligungen für das Untersuchungsgebiet im Langholz, Kanton Aargau, sowie an Frau Corina Schiess, Fachstelle Naturschutz des Kantons Zürich, für die Bewilligung der Experimente im Naturschutzgebiet Thurauen. Dieses Projekt wäre nicht möglich gewesen ohne die 17 Studienteilnehmerinnen und Studienteilnehmer, welche während den Feld- und Laborarbeiten zuverlässig und mit grossem Engagement mitgewirkt haben, sowie Mervi Laitinen, die uns bei den Feld- und Laborarbeiten sowie der Datenerfassung unterstützte. Ein Dank geht auch an Dr. Gabi Müller und Prof. em. Peter Lüthy für die Hinweise über das Naturschutzgebiet Thurauen. Herzlichen Dank an die Firma Vifor Pharma, im Besonderen an Dr. Burkhard Kriwet, für die Bereitstellung der beiden Repellentien. Wir danken auch den Rangern der Thurauen für die Informationen über das Gebiet sowie unserem zuverlässigen und flexiblen Taxifahrer, Herrn Peter Hinnen, für die sicheren Fahrten unserer Teilnehmenden vom Bahnhof zum Untersuchungsgebiet und zurück. Last but not least möchten wir uns herzlich bei unserem Mückenzüchtteam, Salome Keller, Nadja Wipf und Danica Jančárová bedanken, welches tausende Mücken für die Käfigversuche bereitstellte.

6 Literaturverzeichnis

1. Debboun, M. and D. Strickman, *Insect repellents and associated personal protection for a reduction in human disease*. Medical and Veterinary Entomology, 2013. **27**(1): p. 1-9.
2. Agency, E.U.S.E.P., *EPA: Product Performance Test Guidelines*. 2010.
3. WHO, *Guidelines for Efficacy Testing of Mosquito Repellents for Human Skin*. 2009, Geneva: World health Organization.
4. Liberati, A., et al., *The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate healthcare interventions: explanation and elaboration*. Bmj-British Medical Journal, 2009. **339**: p. 37.
5. Roberts, J.R. and J.R. Reigart, *Does anything beat DEET?* Pediatric Annals, 2004. **33**(7): p. 444-453.
6. Carroll, S.P. and J. Loye, *PMD, a registered botanical mosquito repellent with deet-like efficacy*. Journal of the American Mosquito Control Association, 2006. **22**(3): p. 507-514.
7. Colucci, B., et al., *Vorkommen von Stechmücken im Naturwaldreservat Langholz, Kanton Aargau*. 2015, Swiss Tropical and Public Health Institute. p. 26.
8. Schaffner F., A.G., Geoffroy B., Hervy J.-P., Rhaïem A., Brunhes J. , *Les moustiques d'Europe*. 2001.
9. Becker N., P.D., Zgomba M., Boase C., Madon M., Dahl C., Kaiser A., *Mosquitoes and Their Control*. Second Edition ed. 2010: Springer Verlag.
10. Wickham, H., *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. 2nd ed. 2016, New York: Springer.
11. Therneau, T., *Survival: Survival Analysis, Including Penalised Likelihood*. 2011.
12. Fleming, T.R., *A class of rank test procedures for censored survival data*. Biometrika, 1982. **69**: p. 553–566.
13. Barnard, D.R., et al., *Mosquito density, biting rate and cage size effects on repellent tests*. Medical and Veterinary Entomology, 1998. **12**(1): p. 39-45.
14. A. A. KHAN, H.I.M., and DEREK L. SKIDMORE, *Insect Repellents: Effect of Mosquito and Repellent-related Factors on Protection Time*. JOURNAL OF ECONOMIC ENTOMOLOGY, 1976. **Vol. 68, no. 1**.
15. Uzzan, B., et al., *Efficacy of four insect repellents against mosquito bites: a double-blind randomized placebo-controlled field study in Senegal*. Fundamental & Clinical Pharmacology, 2009. **23**(5): p. 589-594.
16. Tawatsin, A., et al., *Repellency of volatile oils from plants against three mosquito vectors*. J.Vector.Ecol., 2001. **26**(1): p. 76-82.
17. Kweka, E.J., et al., *Protective efficacy of menthol propylene glycol carbonate compared to N, N-diethyl-methylbenzamide against mosquito bites in Northern Tanzania*. Parasites & Vectors, 2012. **5**.
18. Frances, S.P., et al., *Laboratory and Field Evaluation of Ss220 and Deet Against Mosquitoes in Queensland, Australia*. Journal of the American Mosquito Control Association, 2009. **25**(2): p. 174-178.
19. Schofield, S., M. Tepper, and R. Gadawski, *Laboratory and field evaluation of the impact of exercise on the performance of regular and polymer-based deet repellents*. J Med Entomol, 2007. **44**(6): p. 1026-31.
20. Frances, S.P., et al., *Laboratory and field evaluation of commercial repellent formulations against mosquitoes (Diptera : Culicidae) in Queensland, Australia*. Australian Journal of Entomology, 2005. **44**: p. 431-436.
21. Tuetun, B., et al., *Repellent properties of celery, Apium graveolens L., compared with commercial repellents, against mosquitoes under laboratory and field conditions*. Trop.Med.Int.Health, 2005. **10**(11): p. 1190-1198.
22. Trongtokit, Y., et al., *Laboratory and field trial of developing medicinal local Thai plant products against four species of mosquito vectors*. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2004. **35**(2): p. 325-33.

23. Thavara, U., et al., *Laboratory and field evaluations of the insect repellent 3535 (ethyl butylacetylaminopropionate) and DEET against mosquito vectors in Thailand*. Journal of the American Mosquito Control Association, 2001. **17**(3): p. 190-195.
24. Frances, S.P., *Field Evaluation and User Acceptability of Repellent Formulations Containing Deet against Mosquitoes in Australia*. Journal of the American Mosquito Control Association, 2013. **29**(3): p. 289-292.
25. Qualls, W.A., et al., *Field Evaluation of Commercial Repellents Against the Floodwater Mosquito Psorophora columbiae (Diptera: Culicidae) in St. Johns County, Florida*. Journal of Medical Entomology, 2011. **48**(6): p. 1247-1249.
26. Frances, S.P., et al., *Comparative Field Evaluation of Repellent Formulations Containing Deet and Ir3535 against Mosquitoes in Queensland, Australia*. Journal of the American Mosquito Control Association, 2009. **25**(4): p. 511-513.
27. Schofield, S., M. Tepper, and R. Gadawski, *Field evaluation against mosquitoes of regular and polymer-based deet formulations in Manitoba, Canada, with comment on methodological issues*. J Med Entomol, 2007. **44**(3): p. 457-62.
28. Naucke, T.J., et al., *Field evaluation of the efficacy of proprietary repellent formulations with IR3535((R)) and Picaridin against Aedes aegypti*. Parasitology Research, 2007. **101**(1): p. 169-177.
29. Moore, S.J., et al., *A low-cost repellent for malaria vectors in the Americas: results of two field trials in Guatemala and Peru*. Malar J, 2007. **6**: p. 101.
30. Frances, S.P., et al., *Field evaluation of commercial repellent formulations against mosquitoes (Diptera : Culicidae) in northern territory, Australia*. Journal of the American Mosquito Control Association, 2005. **21**(4): p. 480-482.
31. Frances, S.P., et al., *Field evaluation of repellent formulations containing deet and picaridin against mosquitoes in Northern Territory, Australia*. Journal of Medical Entomology, 2004. **41**(3): p. 414-417.
32. Frances, S.P., et al., *Field evaluation of repellent formulations against daytime and nighttime biting mosquitoes in a tropical rainforest in northern Australia*. Journal of Medical Entomology, 2002. **39**(3): p. 541-544.
33. Barnard, D.R., et al., *Repellency of IR3535, KBR3023, para-menthane-3,8-diol, and deet to black salt marsh mosquitoes (Diptera : Culicidae) in the Everglades National Park*. Journal of Medical Entomology, 2002. **39**(6): p. 895-899.
34. Debboun, M., et al., *Field evaluation of deet and a piperidine repellent against Aedes communis (Diptera : Culicidae) and Simulium venustum (Diptera : Simuliidae) in the Adirondack mountains of new York*. Journal of Medical Entomology, 2000. **37**(6): p. 919-923.
35. Logan, J.G., et al., *Arm-in-cage testing of natural human-derived mosquito repellents*. Malar.J., 2010. **9**: p. 239.
36. Webb, C.E. and R.C. Russell, *Insect repellents and sunscreen: implications for personal protection strategies against mosquito-borne disease*. Australian and New Zealand Journal of Public Health, 2009. **33**(5): p. 485-490.
37. Cilek, J.E., J.L. Petersen, and C.F. Hallmon, *Comparative efficacy of IR3535 and DEET as repellents against adult Aedes aegypti and Culex quinquefasciatus*. Journal of the American Mosquito Control Association, 2004. **20**(3): p. 299-304.
38. Fradin, M.S. and J.F. Day, *Comparative efficacy of insect repellents against mosquito bites*. New England Journal of Medicine, 2002. **347**(1): p. 13-18.
39. Obermayr, U., A. Rose, and M. Geier, *A Novel Test Cage With an Air Ventilation System as an Alternative to Conventional Cages for the Efficacy Testing of Mosquito Repellents*. Journal of Medical Entomology, 2010. **47**(6): p. 1116-1122.
40. Tawatsin, A., et al., *Repellency of volatile oils from plants against three mosquito vectors*. Journal of Vector Ecology, 2001. **26**(1): p. 76-82.
41. Govere, J., et al., *Efficacy of three insect repellents against the malaria vector Anopheles arabiensis*. Medical and Veterinary Entomology, 2000. **14**(4): p. 441-444.
42. Tavassoli, M., et al., *Repellency Effects of Essential Oils of Myrtle (Myrtus communis), Marigold (Calendula officinalis) Compared with DEET against Anopheles stephensi on Human Volunteers*. Iranian Journal of Arthropod-Borne Diseases, 2011. **5**(2): p. 10-22.

43. Solomon, B., T. Gebre-Mariam, and K. Asres, *Mosquito Repellent Actions of the Essential Oils of Cymbopogon citratus, Cymbopogon nardus and Eucalyptus citriodora: Evaluation and Formulation Studies*. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 2012. **15**(5): p. 766-773.
44. MeteoSchweiz, *Klimabulletin Jahr 2015*. 2016: Zürich.
45. Moore, S.J., A. Lenglet, and N. Hill, *Field evaluation of three plant-based insect repellents against malaria vectors in Vaca Diez province, the Bolivian Amazon*. Journal of the American Mosquito Control Association, 2002. **18**(2): p. 107-110.

Chapter 8

Curriculum vitae



...at work

CURRICULUM VITAE

Barbara Colucci

**E-Mail:** barbara.colucci@swisstph.ch**Date of birth:** February 14th 1983**Nationality:** Swiss**Home town:** Murgenthal (AG)**Profiles:** Linked In, Research Gate

EDUCATION

- Sep 2013 - Dec 2017** **PhD in Epidemiology at the Swiss Tropical- and Public Health Institute** in Basel, Switzerland, associated Institute of the University of Basel, Switzerland
- 2013 - 2017** PhD program in Public Health: Swiss School of Public Health (SSPH+)
- 2013 - 2017** Planning and conducting different repellent tests at Swiss TPH for national and international companies following international guidelines
- 2013 - 2016** Support of students during the “Blockkurs” at the Swiss TPH
- 2007 - 2009** **Master of Science in Animal Biology**, University of Basel
Title: “Seasonal Changes in the Systematic Diversity of Plankton in the Strait of Gibraltar”, Supervisor Prof. Dr. David G. Senn
- 2004 - 2007** **Bachelor of Science in Biology**, University of Basel
Major in Integrative Biology (molecular biology and organismic biology)
- 2004** **Matura**

WORK EXPERIENCE

- 2013** **Scientific collaborator (4 months)**
Kantonale Verwaltung Aargau, Abteilung Wald, Sektion Ökologie
New data base (nature protection), neobiota, organisation of a workshop
- 2011** **Biologist, Internship (6 months)**
Kantonale Verwaltung Aargau, Abteilung Wald, Sektion Ökologie
GIS, Oak mapping, neobiota, photography, date base (pictures), forest ecology
- 2010** **Research associate (9 months)**
Anatomical Institute of the University of Basel, Department of Biomedicine
Osteoporosis-Research, laboratory (Histology), analysis (CT pictures, 3D-modelling of bones), Anatomisches Museum Basel
- 2009** **Biologist (1 month)**
Red Sea Environmental Centre (RSEC), El Quseir, Egypt
Marine biology, presentations, script: “Plankton im Roten Meer”
- 2008 - 2010** **Scientific assistant**
Zoological Institute, University of Basel
Supporting students on excursions and courses, gave presentations on vertebrates, plankton and marine biology (Museum Zurich, Musée d'Histoire Naturelle Paris, Banyuls-sur-Mer (France), Tarifa (Spain))

FURTHER EDUCATION

- 2017 **Advances in Infection Biology, Epidemiology and Global Public Health**, seminar at Swiss TPH (2014 - 2017)
- 2016 **Arbeitsgruppe Invasive Neobiota (AGIN), conference**, Olten (CH)
- 2016 **Course 'Sensory Ecology'**, Lund University, Sweden (2 weeks)
- 2016 **Course 'Vector Population Biology and Control'**, Liverpool School of Tropical Medicine, England (5 weeks)
- 2016 **Biologie des Litorals (Erquy)**, (course, University of Basel)
- 2016 **'How to Improve Your Negotiation Skills'**, transferable skills, University of Basel (2 days)
- 2016 **Course: Postergestaltung**
- 2016 **Journal Club (Swiss TPH, PPHS)**
- 2015 **Bestimmen von einheimischen Insekten**, (semester course, University of Basel)
- 2015 **Management von naturnahen Gebieten** (semester course, University of Basel)
- 2015 **Konfliktmanagement - Strategien, Techniken & Praxis-Tipps zur Klärung und Prävention von Konflikten**, transferable skills, University of Basel (2 days)
- 2015 **Einführung in die Statistik mit Beispielen aus der Biologie II**, (semester course, University of Basel)
- 2015 **Arbeitsgruppe Invasive Neobiota (AGIN), conference**, Olten (CH)
- 2014 **Writing in the Natural Sciences**, language centre (semester course, University of Basel)
- 2014 **Invasionsbiologie** (semester course, University of Basel)
- 2014 **Protozoologie** (semester course, University of Basel)
- 2011 **ArcGIS – Course with certificate**, Canton of Aargau, Aarau (3 days)
- 2010 **Plankton course** at the Alfred-Wegener-Institute, Helmholtz-Zentrum für Polar- und Meeresforschung, Sylt, Germany (1 week)

CONFERENCE CONTRIBUTIONS

- Colucci, B. & Müller, P. (2017). Mosquito repellents – Can lab studies predict the efficacy in the field? Swiss Vector Entomology Group, Scientific Meeting, Lausanne, Switzerland.
- Colucci, B. & Müller, P. (2016). Measuring protection times of mosquito repellents under different conditions with human volunteers. 22nd Sensory Ecology Course, Lund University, Sweden.
- Colucci, B. & Müller, P. (2016). Biodiversität und Gesundheit: Stechmückendiversität im Naturwaldreservat Langholz, Kanton Aargau. Jahrestagung des Swiss Forum on Conservation Biology (SWIFCOB), Bern, Schweiz.
- Colucci, B. & Müller, P. (2015). Comparison of laboratory and field methods for measuring mosquito repellent efficacy. 64th Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene, Philadelphia, Pennsylvania, USA.
- Colucci, B. & Müller, P. (2014). Do arm-in-cage tests replace field studies? A systematic review. 19th Conference of the European Society of Vector Ecology, Thessaloniki, Greece.
- Colucci, B. & Müller, P. (2014). Evaluation of topical mosquito repellents and interpretation of efficacy data: a systematic review. 8th International Conference on Urban Pests. Zürich, Switzerland.

PUBLICATIONS

- Colucci, B. & Müller, P. (2018). Evaluation of standard field and laboratory methods to compare protection times of the topical repellents PMD and DEET. *Scientific Reports – Nature (submitted)*
- Colucci, B. & Müller, P. (2017). Comparison of field and laboratory efficacy studies of topical repellents – a systematic review. *Manuscript for Parasites and Vectors*

Colucci, B. & Müller, P. (2017). A new air ventilation system for repellent testing with the WHO arm-in-cage test. *Manuscript for Parasites and Vectors*

Colucci, B. & Müller, P. (2016). Evaluation von Repellentien gegen Stechmücken und deren Interpretation unter der Europäischen Biozidverordnung. *Studie im Auftrag des Bundesamtes für Gesundheit*.

Colucci, B., Suter, T., Vavassori, L. und Müller, P. (2015). *Vorkommen von Stechmücken Im Naturwaldreservat Langholz, Kanton Aargau. Studie Im Auftrag des Kantons Aargau*.

Colucci, B. & Müller, P. (2016). Stechmückendiversität. GEO Tag der Artenvielfalt, Zofingen (Kanton Aargau), Schweiz.

Colucci, B. & Müller, P. (2015). Stechmückendiversität. GEO Tag der Artenvielfalt, Holderbank (Kanton Aargau), Schweiz.

Colucci, B. & Müller, P. (2014). Evaluation of topical mosquito repellents and interpretation of efficacy data: a systematic review. In *Proceedings of the 8th International Conference on Urban Pests*. Zürich: OOK-Press Kft.

Colucci, B. (2009). Seasonal Changes in the Systematic Diversity of Plankton in the Strait of Gibraltar. MSc Thesis, Universität Basel.

VOLUNTARY WORK (TEACHING)

2017 **World Oceans Day**, Zoo Basel: „Wunderwelt Plankton“
2015 - 2017 **Day of Biodiversity** (Holderbank, Zofingen, Erlinsbach, (2 day events)), Canton of Aargau, Excursion about mosquitoes (1 hour), field work, species list, report
2013 - 2016 **Blockkurs at Swiss TPH** (1-2 weeks, project work with Bachelor students)
2009 - 2013 **OceanCare**: worked on a sailing ship as a scientific guide with six volunteers in France (Côte d'Azur). Topics: whale research, presentations on marine ecology and their protection, pollution, fish diversity. Final report and species list: micro plankton (phyto- and zooplankton)

COMPUTER SKILLS

Windows: Word, Excel, PowerPoint, MATLAB, CT Analyse

ArcGIS

Linux, Ubuntu: Slicer 3-D

Endnote library X7

Date bases for pictures: ThumpsPlus, ACDSee

Statistics: R

LANGUAGE SKILLS

German: mother tongue	Italian: basic knowledge
English: fluent, spoken and written	Spanish: basic knowledge
French: good, spoken and written	Latin: basic knowledge